

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



**EFFECTOS DE LA PIOGLITAZONA SOBRE
CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE
RATAS Y PACIENTES, Y SOBRE CÉLULAS
PROGENITORAS ENDOTELIALES HUMANAS:
PAPEL DEL TGF BETA 1.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Santiago Redondo Blasco

Bajo la dirección de la doctora

Teresa Tejerina Sánchez

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7798-7

© Santiago Redondo Blasco, 2007

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**EFFECTOS DE LA PIOGLITAZONA SOBRE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO
VASCULAR DE RATAS Y PACIENTES, Y SOBRE CÉLULAS
PROGENITORAS ENDOTELIALES HUMANAS: PAPEL DEL TGF BETA 1**

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EUROPEO EN FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA HUMANA

Santiago Redondo Blasco

Madrid, 2007

Directora: Dra. Teresa Tejerina Sánchez

Co-Director: Dr. José Emilio Ruiz Olivar

Teresa Tejerina Sánchez, Catedrática de Farmacología

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral constituye un trabajo original de investigación, realizado bajo mi supervisión, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del mismo modo, se autoriza su presentación por parte del candidato, Santiago Redondo Blasco, para optar al título de Doctor Europeo en Farmacología y Terapéutica Humana.

Teresa Tejerina Sánchez



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
AACHEN

Universitätsklinikum • Kardiovaskuläre Molekularbiologie
Pauwelsstraße 30 - 52057 Aachen

Teresa Tejerina, MD, PhD
Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology
School of Medicine
Universidad Complutense de Madrid
Av. Complutense s/n 28040 Madrid
Spain

**Institut für Kardiovasku-
läre Molekularbiologie**
Institute for Molecular
Cardiovascular Research
IMCAR

Direktor:
Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
RWTH AACHEN

www: www.rwth-aachen.de/mk1
e-mail: cweber@ukaachen.de
Sekretariat: 49-241-80-80580
Telefon: 49-241-80-88692
Fax: 49-241-80-82716
Mobil: 49-173-7373997

Aachen, 28.07.2006

Votum for the European Doctoral Thesis
The effects of the thiazolidinedione pioglitazone on several vascular cell models

by Santiago Redondo, MD

Department of Pharmacology School of Medicine
Universidad Complutense de Madrid

The present PhD thesis of Dr. Santiago Redondo elegantly describes the *in vitro* effects of the thiazolidinedione and PPAR- γ agonist pioglitazone on vascular smooth muscle cells (SMCs) and endothelial progenitor cells (EPCs). In addition, the thesis extends on investigating the role of TGF- β 1 as a possible PPAR- γ independent mediator of the effects of pioglitazone on vascular and progenitor cells. These findings are of particular importance for the biology of vascular cells, especially in the context of diabetes type 2 when vascular complications in terms of macro- and microangiopathy very often occur. Therefore, the present thesis is a significant advance in the biomedical research on remodeling of the vessel wall during diabetic vasculopathy. Furthermore, because diabetes is a well-known risk factor for initiation and progression of atherosclerosis, these current findings are also relevant for the pathology of ischemic cardiovascular disease.

The double-edged action of TGF- β 1 during atherosclerosis is an intensively discussed topic. Taking into account the current immune hypothesis for the development and progression of atherosclerotic plaques, TGF- β 1 may act as a protective compound with immunomodulatory and anti-inflammatory effects. However, several data revealed that during chronic coronary artery disease TGF- β 1 may lose its beneficial role and primarily act as a pathogenic factor, particularly during neointimal growth after endothelial injury. Furthermore, in the context of atherosclerosis diabetes mellitus type 2 has been identified as an established risk factor for endothelial dysfunction during cardiovascular disease. Thiazolidinediones, which are also acting as a PPAR- γ agonists represent one option for pharmacological treatment of diabetes mellitus type 2. A member of this group is pioglitazone.

Universitätsklinikum Aachen (UKA)
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Aachen
Pauwelsstraße 30 • D 52057 Aachen

Aufsichtsratsvorsitzende:
Christa Herrmann

Vorstandsvorsitzender:
Univ.-Prof. Dr. Henning Saß

Kaufmännischer Direktor:
Detlef Klimpe

Banken:
Sparkasse Aachen
(BLZ 390 500 00) 13004015
Deutsche Bank
(BLZ 390 700 20) 1119999

Notably, it has been shown that pioglitazone improve endothelial function, reduce serum marker of inflammation and increase anti-atherogenic factors. Therefore, further investigations on the effects of this compound on vascular cells, but also EPCs are highly relevant for understanding the biology of the vessel wall.

From the methodological point of view, the present thesis is very accurately performed and the techniques used adequately respond to the main hypothesis. These methods encompass analysis of cell viability, apoptosis, proliferation, protein expression and cell adhesion in flow. This is accomplished by several well-established techniques, including flow cytometry, Western blotting, ELISA, confocal microscopy and a parallel wall flow chamber model. An important advantage of the present thesis resides in the use of cultured human vascular SMCs from diabetic and non-diabetic subjects. Another asset includes the investigation on isolated human EPCs, which have been shown to effectively contribute to endothelial repair and regeneration. Only few concepts need further clarification and improvement. For example, I will suggest to additionally investigating the effects of TGF- β 1 blockade by specific antibody on the adhesion of EPCs in flow, especially after treating EPCs with 10 μ M pioglitazone. Furthermore, the possible mechanism of improved EPC adhesion on fibronectin in flow after incubating the cells wit 1 μ M pioglitazon will be discussed. In this case, it would be conceivable that such an adhesion might be explained by an up-regulation in avb5 integrins, which are responsible for the binding to fibronectin matrix. Such an integrin up-regulation has been for example demonstrated after treating EPCs with statins.

Dr. Redondo has published research articles as a first author in high-impact medical journals (*Circulation*, *Diabetes*) and presented data on international conferences (e.g. The FASEB meeting, San Francisco, 2006). Furthermore, he attended further published articles as a prominent co-author in *Diabetes* and *European Journal of Pharmacology*. Therefore, the professional expertise of Dr. Redondo on the field of TGF- β 1 and PPAR- γ signaling in vascular cells needs to be highly acknowledged and this is further confirmed by the excellent doctoral thesis submitted.

Taken together, the present doctoral thesis is an impressive and appropriately performed work with significant novelty for the cardiovascular research field, that should accepted with honors.

With sincerel regards,



Christian Weber, MD
Professor of Molecular Cardiology

School of Biomedical & Health Sciences

Cardiovascular Division
New Hunt's House (Rm 2.34B)
Guy's Hospital Campus
London SE1 1UL, U.K.

Tel +44 (0)20-7848-6209
Fax +44 (0)20-7848-6220
Email giovanni.mann@kcl.ac.uk

Giovanni E. Mann, PhD
Professor of Vascular Physiology
Head of Graduate Research Studies

KING'S
College
LONDON

University of London

October 10, 2006

Tel/Fax +34 9193941476
Email teje@med.ucm.es

Professor Teresa Tejerina
Department of Pharmacology
School of Medicine
Universidad Complutense de Madrid
Av. Complutense s/n 28040 Madrid
Spain

Dear Professor Tejerina,

Re: Santiago Redondo European PhD Thesis

I am writing to confirm that I have evaluated an extended English summary of the PhD thesis to be submitted by Santiago Redondo for the award of a European PhD in the Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid in February 2007.

Introduction (p. 1-20)- The Introduction provides a clear overview of the background to the field of atherosclerosis and the role of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in modulating the progression of atherosclerosis and restenosis, as well as, an overview of treatments for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. The introduction also briefly reviews (i) the mechanisms underlying regulation of signal transduction by TGF- β 1 in vascular smooth muscle and (ii) the role of vascular progenitor cells in revascularisation in ischaemic heart disease. The reader is introduced to the use of pioglitazone as an antidiabetic drug and this section is well written and referenced.

Methods (p. 21-29) - The Methods provide a brief overview of the experimental protocols used and presumably in the final thesis will contain more detailed information on experimental protocols and rationale for selection of drug concentrations and incubation time points. The Methods sub-sections would benefit from cited references to guide the reader to classical papers. For example, the section on endothelial progenitor cells (see page 22) will require further information. I am certain that the candidate will be able to readily address these comments in his final thesis.

Results (p. 30-36) - This section summarizes the experiments to be included in the final thesis, highlighting the effects of pioglitazone on vascular smooth muscle proliferation and apoptosis. Subsequent experiments show that pioglitazone increases TGF- β 1 secretion and that this level of TGF- β 1 is associated with apoptosis, which was inhibited by the PPAR- γ antagonist GW9662. Application of confocal microscopy enabled the candidate to identify phospho-Smad2 staining coinciding with the time course of TGF- β 1 release by rat aortic smooth muscle cells. Further experiments were conducted with smooth muscle cells isolated from internal mammary artery obtained from non-diabetic and diabetic patients. Interestingly, there were no detectable differences in pioglitazone mediated apoptosis in both cell types cultured in normal glucose, but in the presence of elevated glucose (15 mM) pioglitazone increased

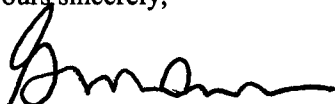
apoptosis. It would be helpful to compare the actions of this anti-diabetic drug in rat versus human smooth muscle cells, and to address why the time course of TGF- β 1 secretion differed in non-diabetic and diabetic smooth muscle cells. Finally, experiments with endothelial progenitor cells evaluate the actions of pioglitazone on proliferation, adhesion and TGF- β 1 secretion.

Discussion (p. 37-42 + references) - The Discussion concludes that TGF- β 1 function is diminished in smooth muscle cells in vascular diseases such as atherosclerosis and diabetes. The candidate has focused principally on the experiments with endothelial progenitor cells, and I would advise that the Discussion is developed further to compare rat versus human smooth muscle experiments (including a more detailed analysis of non-diabetic versus diabetic data) and that the final section(s) of the Discussion link the work in smooth muscle with the endothelial progenitor cell experiments. Perhaps the candidate could consider including schematic models in the Introduction (TGF- β 1/Smad signalling) and key summary schematic models in the final Discussion to highlight the key findings of this PhD research programme.

I am satisfied that the candidate has conducted the reported experiments carefully and, based on the English summary of the thesis, am convinced he will have no problem in completing and presenting a very good PhD thesis in early 2007.

~~I would be delighted to participate in his examination for the award of a European PhD and look forward to reading the final thesis.~~

Yours sincerely,



Giovanni E. Mann
Professor of Vascular Physiology
Head of Graduate Research Studies

Juramento Hipocrático

Juro por Apolo médico, por Esculapio, Higia y Panacea y pongo por testigo a todos los dioses y a todas las diosas, cumplir según mis posibilidades y entendimiento el siguiente juramento:

"Estimaré como a mis padres a aquél que me enseñó este arte, haré vida común con él, y si es necesario partiré con él mis bienes.

Consideraré a sus hijos como hermanos míos y les enseñaré este arte sin retribución ni promesa escrita, si necesitaren aprenderlo.

Comunicaré los principios, lecciones y todo lo demás de la enseñanza a mis hijos, a los del Maestro que me ha instruido, a los discípulos regularmente inscriptos y jurados según los reglamentos, pero a nadie más.

Aplicaré los regímenes en bien de los enfermos, según mi saber y entender y nunca para mal de nadie.

No daré a nadie por complacencia un remedio mortal o un consejo que lo induzca a su pérdida.

Tampoco daré a una mujer un pesario que pueda dañar la vida de un feto.

Conservaré puros mi vida y mi arte.

En cualquier casa en que penetre lo haré para el bien de los enfermos, evitando todo daño voluntario y toda corrupción, absteniéndome del placer del amor con las mujeres y los hombres, los libres y los esclavos.

Todo lo que viere u oyere en el ejercicio de la profesión y en el comercio de la vida común y que no deba divulgarse, lo conservaré como secreto.

Si cumplo íntegramente este juramento, que pueda gozar dichosamente de mi vida y mi arte y disfrutar perenne gloria entre los hombres.

Si lo quebranto, que me suceda lo contrario".

Hipócrates de Cos.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al presentar esta Tesis, desearía agradecer la colaboración y el apoyo prestado por diversas instituciones, elementos que han resultado ser imprescindibles para la consecución del presente trabajo.

- La Universidad Complutense de Madrid me ha formado como médico y como farmacólogo, dándome la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora.
- Dentro de ella, el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina tuvo a bien admitirme como estudiante-colaborador desde mi paso por él como alumno, lo que para mí supuso la consecución de un sueño.
- El Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid contribuyó a mi formación médica y a mi primer contacto con la Medicina clínica.
- El Centro de Apoyo a la Investigación de Microscopía y Citometría, así como la Biblioteca de la Facultad de Medicina, han sido, en mi universidad, dos valiosísimos aliados en la investigación que ha dado lugar a esta Tesis.
- El Clínico Universitario San Carlos, en sus Servicios de Cirugía Cardíaca y de Análisis Clínicos, ha contribuido de forma determinante al enfoque aplicado de esta tesis doctoral.
- El aprendizaje científico y técnico referente a las células progenitoras endoteliales lo hice en la Clínica Universitaria de Aquisgrán (Universitätsklinikum Aachen) de Alemania, en su prestigioso Instituto de Investigación Cardiovascular Molecular. Agradezco profundamente a

este centro no sólo el haberme aceptado por tres meses (un verdadero logro en sí mismo), sino la enseñanza que me transmitieron en ciencia y en filosofía de trabajo.

- La Sociedad Española de Arteriosclerosis ha apoyado mi formación científica, ayudándome a la asistencia a sus XVIII y XIX Congresos Nacionales.
- También agradezco sobremanera la acogida que me ha prestado el Grupo de Estudio de la Patogenia de la Aterosclerosis de la Sociedad Europea de Cardiología.
- Debo reconocer el decisivo apoyo financiero que me ha prestado el Ministerio de Educación de España. En primer lugar mediante la Beca de Colaboración para Estudiantes de Último Año, y la Beca predoctoral FPU (Formación de Profesorado Universitario), incluyendo el plan de estancias breves de este estratégico programa.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

No puedo dejar de agradecer el apoyo prestado por muchas personas, tan necesarias para esta Tesis como su autor. Siento que la naturaleza sucesiva del lenguaje no concuerde a veces con la simultaneidad del espíritu.

En primer lugar, quiero dar gracias a mi familia. A mis padres y hermanos (Conrado, Fátima y Miguel). Ser médico y ser investigador es más difícil de lo que parece. A veces uno se siente incomprendido. No por ellos. Me apoyaron y creyeron en mí desde el principio.

Mis amigos de toda la vida, José Julio, Rosa, Carlos Rodríguez, Jaime y Pedro, siempre han estado conmigo y me han apoyado en todo. Gracias.

La Profesora Teresa Tejerina Sánchez, del Departamento de Farmacología, es hoy la Directora de mi Tesis. Ha sido, es y será mi maestra y mentora, y a quien siempre agradeceré el haberme introducido en el apasionante mundo de la investigación. No es fácil creer en un chaval de veinte años. Ella lo hizo. Incondicionalmente y más que yo mismo.

Mis primeras compañeras (Merche, Miriam, Patricia y Mariu), hoy Doctoras, me recibieron en el grupo con simpatía y espíritu de equipo. Patricia me enseñó a cultivar células. Mariu fue una excelente compañera durante varios años y una amiga para siempre.

Gracias a mi compañero y amigo, el Doctor Carlos García Santos-Gallego. Juntos empezamos a investigar en el Departamento mientras estudiábamos la carrera. Es un gran hombre y un gran médico.

Desde su retorno, el Doctor Emilio Ruiz Olivar ha sido un factor decisivo en mi formación científica. La gran mayoría de mis conocimientos técnicos de laboratorio me han sido transmitidos por él. Agradezco sobremanera su amistoso apoyo, ayuda y compañerismo.

El Doctor Antonio Gordillo Moscoso ha sido un gran compañero y un poderoso revulsivo para el grupo y para la investigación translacional en España. Ahora le toca llevar sus ideas a México, su tierra. Lo conseguirá y mejorará.

Todos los miembros del Departamento de Farmacología, Profesores e Investigadores de todos los rangos, me han transmitido su ejemplo de trabajo y coherencia. También lo fueron todos mis profesores de la Facultad y de los Hospitales universitarios asociados. Este Departamento ha sido para mí un lugar acogedor. Mi humilde trabajo desea seguir a su servicio en el futuro.

Agradezco el amable trato que me han dispensado todos mis compañeros: Borja, Javi, Marta, David, Fede, Giovanna, Laura Moreno...Deseo agradecer también el compañerismo, amistad y aprecio que siempre me ha regalado el equipo de la Profesora Isabel Colado Megía (Dra. Esther O'Shea, Dr. Jorge Camarero, Dra. Verónica Sánchez, Dra. Laura Orío, Dra. Isabel Escobedo, María Izco, Inés Peraile, Noemí Llopis, Elisa Torres, Ignacio Cotillo).

En Alemania, el Profesor Christian Weber y el Doctor Mihail Hristov me han dado un inmenso aprendizaje y ejemplo. Gracias a ellos me introduje en el fantástico mundo de los progenitores vasculares. Agradezco y saludo a todos los integrantes de su equipo “Moka Team”. Yo les deseo suerte. Ellos la conquistan todos los días a través de su trabajo intenso y de calidad. Será un placer colaborar siempre con gente así.

También agradezco su labor de evaluación de esta Tesis al Profesor Giovanni Mann, del King’s College de Londres.

Por último, deseo expresar mi agradecimiento hacia todas las personas del Hospital Clínico San Carlos de Madrid que creen en mi mismo sueño: poner la investigación básica al servicio de la Medicina, de manera que, como dijo Schiller, la magia una de nuevo lo que la desgraciada costumbre separó. Aunque me dejo a muchos en el tintero, quiero mencionar especialmente a los Doctores Reguillo, O’Connor, Martínez-Rocafor, Carnero y Rodríguez (Servicio de Cirugía Cardíaca), y Doctoras Cárdenas y Torrejón (Servicio de Análisis Clínicos).

Invictus

Out of the night that covers me,
Black as the Pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.
In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.
Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds, and shall find, me unafraid.
It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate
I am the captain of my soul

William Ernest Henley (1849-1903)

LISTA DE ABREVIATURAS

- EPCs: Células progenitoras endoteliales
- TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta
- VSMC: Células de músculo liso vascular
- XTT:(Sodio3,3,-[Fenilamino)carbonil]-3,4-Tetrazolio-Bis(4-metoxi-6-nitro)ácido bencenosulfónico hidratado)
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- BrdU: Bromo-deoxi-uridina
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- ELISA: Ensayo por absorbancia mediante anticuerpos ligados a enzimas
- PIO: Pioglitazona
- PPAR- γ : receptor de peroxisoma activado por proliferación
- ALK: Kinasas relacionadas con activina
- CFU: Unidades formadoras de colonias
- KDR: Receptor con dominio kinasa inserto
- FACS: Citometría de flujo medida por fluorescencia
- Th1/Th2/Th3: Función de células T colaboradoras 1/2/3
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- P-CAM: Molécula de adhesión celular plaquetaria
- I-CAM: Molécula de adhesión celular intercelular
- V-CAM: Molécula de adhesión celular vascular
- SDF: Factor derivado del estroma
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- IL-1: Interleuquina 1

- IL-6: Interleuquina 6
- IL-10: Interleuquina 10
- tPA: Activador del plasminógeno tisular
- PAI: Inhibidor de activador del plasminógeno
- IP3: Trifosfato de inositol
- MAP: Proteína activada por mitógenos
- ERK: Kinasa de regulación extracelular
- AT: Receptor de angiotensina
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- AGE: Elementos de glicación avanzada
- RAGE: Receptores de elementos de glicación avanzada
- MCP-1: Proteína quimio-atrayente de monocitos 1
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad
- DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
- FCS: Suero fetal bovino
- RPMI: Instituto de manufactura y prototipado rápido
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- NADH: Nicotin-adenín-dinucleótido hidrogenado
- TRIS: Trizma base
- PI: Yoduro de propidio
- -15dPGJ2: 15-deoxi-prostaglandina J2 alpha
- HRP: Peroxidasa de rábano
- MTP: Placa de tapadera movable
- HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-etano-ácido sulfónico
- HBSS: Solución salina tamponada de Hank

- PVDF: fluoruro de polivinildeno
- TBS: Solución salina tamponada con trizma base
- ECL: Dispositivo de ampliación de quimioluminiscencia
- BSA: Albúmina de suero bovino
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína
- IMC: Índice de masa corporal
- ANOVA: Análisis de la varianza
- HSD: Diferencial honestamente significativa
- DMSO: Dimetil-sulfóxido
- Dil-Ac-LDL: Receptor acetilado de LDL
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- RGD: Arginina-glicina-aspártico
- NFkB: Factor nuclear kappa beta
- STAT1/STAT3: Transductor de señal y activador de transcripción 1/3
- Apo-E: Apolipoproteína E
- PPRE: Elemento de respuesta a PPAR

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	25
1. ATEROSCLEROSIS	26
1.1. Introducción y magnitud del problema	26
1.2. Aterosclerosis: una enfermedad inflamatoria	28
1.2.1. Inflamación el vaso: dimensión celular y tisular	28
1.2.2. Inflamación en el vaso: dimensión molecular	34
1.2.3. La aterosclerosis como enfermedad sistémica	35
1.3. Precursores de origen hemático en la aterosclerosis	36
1.3.1. Antecedentes	36
1.3.2. Células progenitoras endoteliales (EPCs)	37
1.3.3. Células progenitoras de músculo liso vascular	38
2. EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-β) EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	40
2.1. Introducción	40
2.1.1. Regulación de la transducción de la señal	41
2.1.2. Comunicaciones entre la vía del TGF- β 1 y otras vías de señalización	45
2.2. Papel del TGF beta en aterosclerosis	48
2.2.1. Evidencias para un papel antiaterogénico del TGF- β 1	48
2.2.2. Un papel patogénico para el TGF- β 1	49
2.2.3. TGF- β 1: La espada de doble filo	51
2.3. TGF- β en otras enfermedades vasculares	55
2.4. TGF- β y el corazón	56
2.5. Farmacología del TGF- β 1	57

2.5.1. Modulación por moléculas diseñadas hacia esa diana.....	58
2.5.2. Modulación por fármacos cardiovasculares tradicionales.....	60
3. DIABETES TIPO 2 Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	62
3.1. Diabetes mellitus tipo 2.....	62
3.2. Diabetes tipo 2 y síndrome metabólico.....	64
3.3. La diabetes tipo 2 como enfermedad cardiovascular.....	65
3.4. Fisiopatología del daño vascular en la diabetes tipo 2.....	67
4. PIOGLITAZONA EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR DIABÉTICA.....	69
4.1. Introducción a las tiazolidinodionas.....	69
4.2. Miembros del grupo de las tiazolidinodionas.....	72
4.3. Generalidades sobre la pioglitazona.....	74
4.3.1. Estructura fina y mecanismo de acción.....	74
4.3.2. Farmacología clínica de la pioglitazona.....	76
4.3.3. Valor terapéutico de la pioglitazona.....	78
OBJETIVOS.....	80
OBJECTIVES.....	81
MATERIAL Y MÉTODOS.....	82
1. OBTENCIÓN DE DIVERSOS MODELOS CELULARES.....	83
1.1. Modelo de VSMC de aorta de rata.....	83
1.1.1. Manejo de los animales de laboratorio.....	83
1.1.2. Obtención del cultivo primario de las VSMC de rata.....	83
1.2. Obtención de VSMC humanas.....	86
1.2.1. Extracción de las arterias en quirófano.....	86
1.2.2. Aislamiento de VSMC humanas de arteria mamaria.....	86

1.3. Obtención de células progenitoras endoteliales (EPCs) desde sangre humana.....	88
1.3.1. Obtención y manejo de la sangre.....	88
1.3.2. Separación de sangre en gradiente de densidad.....	88
2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	90
2.1. Contaje celular.....	90
2.2. Metabolismo celular (kit de XTT).....	90
2.3. Citotoxicidad celular (actividad de LDH).....	91
2.4. Medida del ciclo celular por citometría de flujo.....	92
2.5. Captación de BrdU (síntesis de DNA).....	93
2.6. Fragmentación de DNA: medición por ELISA.....	94
2.7. Medición de apoptosis por actividad de caspasa-3.....	95
2.8. Adhesión en flujo.....	96
2.9. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	96
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	98
3.1. Extracción y cuantificación de proteínas.....	98
3.2. Técnica de Western Blot para cuantificación de proteínas.....	99
3.3. Localización intracelular de proteínas por microscopía confocal.....	99

3.4. Secreción de proteínas por ELISA de medio condicionado.....	101
3.5. Citometría de flujo para expresión proteica.....	102
4. PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA.....	104
4.1. Selección de pacientes.....	104
4.2. Aspectos éticos y legales.....	105
5. ESTADÍSTICA.....	106
6. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	107
RESULTADOS.....	108
1. EFECTOS SOBRE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATA.....	109
1.1. Viabilidad celular.....	109
1.1.1. Actividad metabólica mitocondrial por ensayo XTT.....	109
1.1.2. Citotoxicidad.....	110
1.1.3. Contaje celular.....	111
1.1.4. Síntesis de DNA.....	112
1.2. Apoptosis.....	113
1.2.1. Fragmentación de DNA: curva de tiempos y concentraciones.....	113
1.2.2. Fragmentación de DNA: efecto del TGF- β 1.....	114

1.2.3. Población celular hipoploide: efecto de PIO y TGF- β 1.....	115
1.2.4. Actividad de Caspasa-3: efecto de PIO y TGF- β 1.....	116
1.3. Secreción de TGF-β1.....	117
1.3.1. Curva de tiempos de secreción de TGF- β 1.....	117
1.3.2. Efecto del PPAR- γ en la secreción de TGF- β mediada por pioglitazona.....	118
1.3.3. Efecto biológico de la concentración de TGF- β 1 encontrada.....	119
1.3.4. Efecto en la secreción de TGF- β 1 de la dPGJ2.....	120
1.4. Señalización por Smad2.....	121
1.4.1. Efecto de PIO y PPAR- γ en la señalización por Smad2.....	121
1.4.2. Efecto del TGF- β 1 en la señalización por Smad2 inducida por pioglitazona.....	126
2. EFECTOS SOBRE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE PACIENTES.....	130
Tabla 1.....	130
2.1. Efectos sobre la proliferación celular.....	131
2.2. Efectos sobre la apoptosis.....	133
2.2.1. Efecto apoptótico de la pioglitazona en concentraciones normoglucémicas.....	133

2.2.2. Efecto apoptótico de la pioglitazona en concentraciones crecientes de glucosa.....	134
2.2.3. Efectos de la vía TGF- β 1/ALK-4/5/7 en el efecto apoptótico de la pioglitazona.....	136
2.3. Efectos sobre la secreción de TGF-β1.....	139
2.3.1. Secreción de TGF- β 1 en pacientes no diabéticos.....	139
2.3.2. Secreción de TGF- β 1 en pacientes diabéticos.....	140
2.4. Efectos de la pioglitazona sobre la localización de pSmad2.....	141
2.4.1. Intensidad citosólica en pacientes no diabéticos.....	142
2.4.2. Intensidad citosólica en pacientes diabéticos.....	143
2.4.3. Intensidad nuclear en pacientes no diabéticos.....	144
2.4.4. Intensidad nuclear en pacientes diabéticos.....	145
2.5. Papel del PPAR-γ y del TGF-β1 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización de pSmad2.....	146
2.5.1. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización citosólica de pSmad2 en pacientes no diabéticos.....	148
2.5.2. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización citosólica de pSmad2 en pacientes diabéticos.....	149

2.5.3. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización nuclear de pSmad2 en pacientes no diabéticos.....	150
2.5.4. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización nuclear de pSmad2 en pacientes diabéticos.....	151
3. EFECTOS SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES DE DONANTES.....	152
3.1. Efectos descriptivos de la pioglitazona sobre cultivos de EPCs.....	152
3.1.1. Efectos morfológicos.....	152
3.1.2. Efectos de la pioglitazona sobre el número total de células en cultivo.....	157
3.1.3. Efectos en el número de unidades formadoras de colonias.....	158
3.1.4. Correlación entre número de células y número de CFU.....	159
3.2. Efectos de la pioglitazona en la caracterización de las EPCs.....	160
3.2.1. Expresión de DiLDL/Lectina.....	160
3.2.2. Expresión de CD31.....	163
3.2.3. Expresión de KDR.....	166
3.2.4. Expresión de CD105 (endoglina).....	169

3.3. Proliferación celular.....	172
3.4. Adhesión celular.....	173
3.5. Secreción de TGF- β 1.....	174
3.6. Dependencia de TGF- β 1 en el efecto bifásico de la adhesión inducido por la pioglitazona.....	175
<i>DISCUSIÓN</i>	176
1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS ALCANZADOS.....	177
2. EFECTOS SOBRE VSMC DE RATA Y HUMANO: DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN A LA APOPTOSIS. POSIBLE PAPEL DEL TGF-B1 COMO FACTOR PROTECTOR.....	178
3. EFECTOS SOBRE EPCS: DEL ESTÍMULO A LA INHIBICIÓN: POSIBLE PAPEL DEL TGF-B1 COMO FACTOR PATOGENICO.....	190
4. COMPLEJIDAD DEL TGF-B1 EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	194
5. LIMITACIONES DEL PRESENTE ESTUDIO. LÍNEAS FUTURAS.....	197
<i>CONCLUSIONES</i>	199
<i>CONCLUSIONS</i>	200
<i>ENGLISH SUMMARY</i>	201

INTRODUCTION	202
1. ATHEROSCLEROSIS	202
1.1. Introduction and importance	202
1.2. Atherosclerosis: an inflammatory disease	203
1.2.1. Inflammation in vessel	203
1.2.2. Atherosclerosis: a systemic disease	204
1.2.3. Vascular progenitor cells	205
2. TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF-β) IN CARDIOVASCULAR DISEASE	206
2.1. Introduction	206
2.1.1. Signal transduction regulation	207
2.2. Role of TGF- β 1 in atherosclerosis and restenosis	209
2.2.1. Evidence for an atheroprotective effect of TGF- β 1	209
2.2.2. A pathogenic role for TGF- β 1	211
2.2.3. TGF- β 1: the double-edged sword	213
3. TYPE 2 DIABETES AND CARDIOVASCULAR DISEASE	216
3.1. Type 2 diabetes mellitus	216
3.2. Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome	217

3.3. Physiopathology of vascular damage in type 2 diabetes.....	218
4. PIOGLITAZONE FOR THE TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS.....	219
4.1. Generalities about pioglitazone.....	219
4.2. Added potential therapeutic value of pioglitazone.....	220
<i>MATERIAL AND METOHDS.....</i>	<i>222</i>
1. CELL CULTURE OBTENTION.....	222
1.1. Rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMC).....	222
1.2. Human internal mammary artery VSMC.....	222
1.3. Obtention of endothelial progenitor cells (EPCs) from human blood.....	223
2. CELL BIOLOGY TECHNIQUES.....	223
2.1. Cell counting.....	223
2.2. Cell metabolic activity.....	223
2.3. Cytotoxicity (LDH activity).....	223
2.4. Cell cycle assessment.....	224
2.5. BrdU uptake.....	224
2.6. DNA fragmentation.....	224
2.7. Caspase-3 cellular activity.....	225

2.8. Flow adhesion assays.....	225
2.9. DNA content.....	225
3. MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES.....	226
3.1. Western Blot.....	226
3.2. Confocal microscopy.....	227
3.3. Protein secretion by ELISA.....	228
3.4. Protein detection by FACS.....	229
4. CLINICAL DATA.....	229
5. STATISTICS.....	230
<i>RESULTS</i>	231
1. EFFECTS ON RAT AORTIC VSMC.....	231
1.1. Effect on proliferation and cytotoxicity.....	231
1.2. Apoptotic effects.....	231
1.3. TGF- β 1 secretion in our model.....	231
1.4. PIO induces Smad2 activation by PPAR- γ	231
1.5. PIO-induced Smad2 activation is TGF- β 1-dependent.....	232
2. EFFECTS ON HUMAN INTERNAL MAMMARY ARTERY VSMC.....	233

2.1. Patient population description.....	233
2.2. Proliferative profile.....	233
2.3. Apoptosis induction.....	233
2.4. Role of TGF- β 1 on the apoptotic effect exerted by PIO.....	233
2.5. PIO-induced TGF- β 1 secretion.....	234
2.6. PIO-induced Smad2 activation.....	234
2.7. Role of PPAR- γ and the TGF- β 1 pathway in PIO-induced Smad2 activation.....	234
3. EFFECTS ON HUMAN ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS (EPCs).....	235
3.1. Biphasic effects of pioglitazone on cell and CFU number.....	235
3.2. Pioglitazone modulates EPC characterization in a biphasic manner.....	235
3.3. Pioglitazone does not affect cell proliferation.....	236
3.4. Biphasic role of pioglitazone on EPC adhesion under flow condition: role of PPAR- γ and TGF- β 1.....	236
3.5. Pioglitazone induces TGF- β 1 secretion: its role in EPC adhesion.....	236
<i>DISCUSSION</i>	238

1. RESULTS OBTAINED IN VSMC	238
2. RESULTS OBTAINED IN EPCs	239
3. SYNTHESIS AND FUTURE LINES: CONCENTRATION-DEPENDENCY IN DIFFERENT CELL LINES	243
Table 1	244
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	245-281

INTRODUCCIÓN

1. ATEROSCLEROSIS

1.1. Introducción y magnitud del problema

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por los depósitos arteriales de placas de ateroma, que pueden terminar originando una trombosis e isquemia de las regiones distales a la lesión. En mayor o menor medida, en todos los individuos parecen existir depósitos en las arterias, evolucionando a lo largo de toda la vida del individuo, sobre todo durante el proceso de envejecimiento de los vasos (Tracy et al., 1995).

Dada la frecuencia de estas lesiones en las series anatomopatológicas, es comprensible que los depósitos en las arterias fueran objeto de un estudio, aunque limitado y descriptivo, desde tiempos inmemoriales que se remontan a los inicios de la Historia de la Medicina.

En las postrimerías del siglo XIX y comienzos del XX, tres geniales patólogos y sus equipos establecieron tres teorías dominantes sobre la etiopatogenia de la aterosclerosis:

- Rokitsansky destacó el papel de la hipercoagulabilidad de la sangre (1852).
- Virchow dio una especial relevancia al papel de la inflamación (1858).
- Atschoff hizo hincapié en la importancia de los lípidos (1908).

A lo largo del siglo XX se redescubrió la importancia clínica, epidemiológica y terapéutica de estas tres vías, así como su interrelación, siendo este un campo aún abierto y emergente. La aterosclerosis es la principal causa de muerte e

incapacidad en el mundo desarrollado, y su aumento es espectacular en los países en vías de desarrollo. En una gran proporción, los enfermos no presentan factores de riesgo conocidos ni están adecuadamente tratados (Moreno y Fuster, 2004).

Un hito fundamental en el estudio de la aterosclerosis se llevó a cabo con las series epidemiológicas de los estudios de Framingham, que acuñaron el concepto de factor de riesgo cardiovascular (Dawber et al., 1951). La mortalidad de esta causa se relacionó con la hipertensión, la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la obesidad y la inactividad física.

La incuestionable importancia clínica del control de la lipidemia para el manejo de la enfermedad cardiovascular, sin embargo, llevó a veces al simplismo de contemplar las lesiones ateroscleróticas como un mero depósito pasivo de lípidos. En los años 90 del siglo XX, sin embargo, multitud de trabajos, revisados brillantemente por Ross (Ross, 1999), volvieron a subrayar con más de un siglo de posterioridad la valía de los conceptos de Rudolf Virchow (Virchow, 1858).

La comprensión conjunta de las teorías inflamatoria, lipídica y hemostática originó un paradigma conocido como “teoría de la respuesta a la lesión”: los estímulos relacionados con los factores de riesgo de Framingham (destacando los de origen lipídico), servirían como gatillo a una reacción inflamatoria crónica, la cual serviría a su vez como estímulo protrombótico (Ross, 1999).

1.2. Aterosclerosis: una enfermedad inflamatoria

1.2.1. Inflamación en el vaso: dimensión celular y tisular

Las lesiones ateroscleróticas tienen lugar en la capa subendotelial. En esa región, se produce un infiltrado de células inflamatorias e inmunológicas, entre las que destacan los macrófagos y los linfocitos T, sobre todo de caracterización Th1 (Zhou et al., 1998). De la misma manera, se aprecia un aumento de células de músculo liso vascular, debido en parte a la hiperplasia y migración de células de la media, que atraviesan la lámina elástica interna (Newby, 2005). Otras células de músculo liso vascular parecen provenir de precursores circulantes cuyo origen sería la médula ósea (Hristov y Weber, 2006). Todas estas células de músculo liso vascular ectópicas aumentan el grosor de la media. Esta media engrosada aumenta el índice íntima-media, que puede medirse en la carótida con gran facilidad por ecografía, y es un marcador de riesgo cardiovascular (Raggi et al., 2005).

Tanto los macrófagos como las células de músculo liso vascular aparecen cargados de grasa (células espumosas), debido sobre todo a la internalización de colesterol LDL a través de receptores “scavenger” (barredores), entre los que destaca el CD36 (Lutgens et al., 2006). Resulta interesante comprobar que este tipo de receptores patológicos presentan una mayor afinidad por las LDL pequeñas, densas y oxidadas, que se han relacionado en mayor medida con la enfermedad cardiovascular (Eckel et al., 2005).

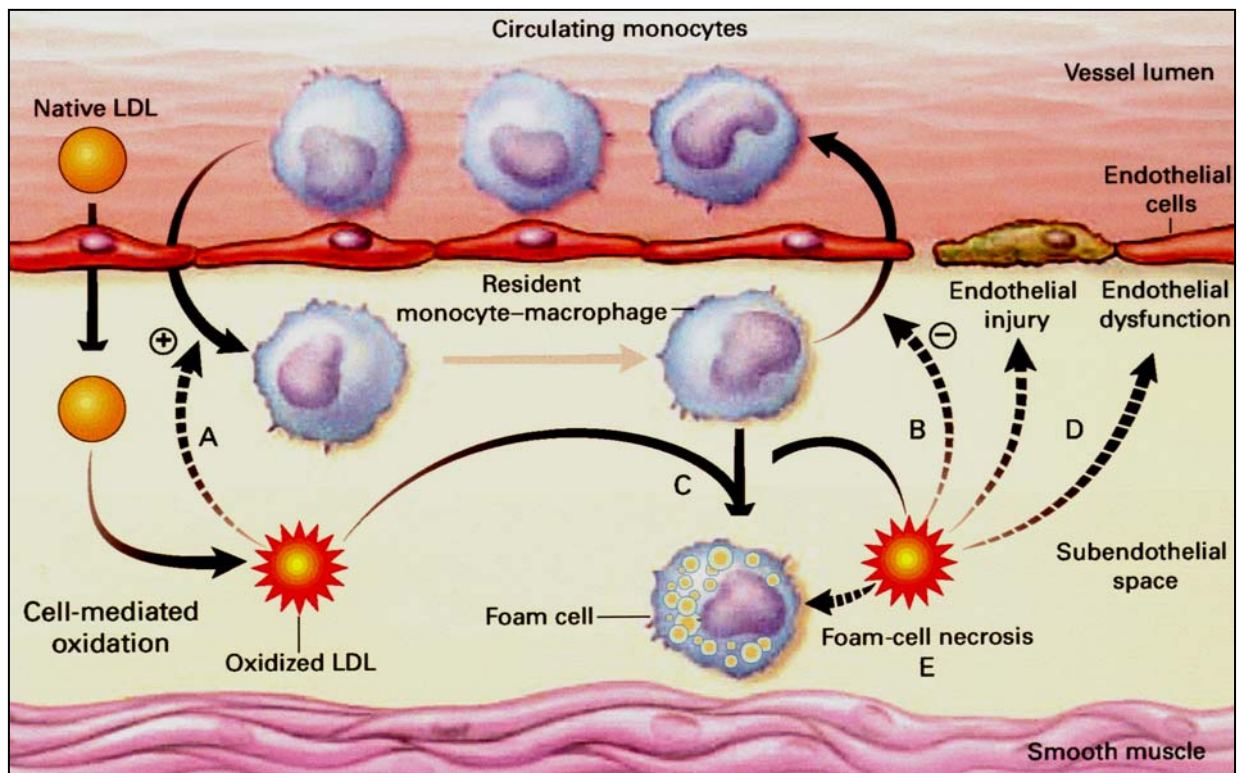


Figura 1: Infiltrado inflamatorio en la aterosclerosis (Ross, 1999, modificado).

Native LDL: LDL (lipoproteína de baja densidad) nativa

Circulating monocytes: Monocitos circulantes

Vessel lumen: Luz vascular

Resident monocyte-macrophage: Monolito-macrófago residente

Endothelial cells: Células endoteliales

Endothelial injury: Daño endotelial

Endotelial dysfunction: Disfunción endotelial

Cell –mediated oxidation: Oxidación mediada por células

Oxidized LDL: LDL oxidada

Foam cell: Célula espumosa

Foam-cell necrosis: Necrosis de células espumosas

Subendothelial space: Espacio subendotelial

Smooth muscle: Músculo liso.

La placa de ateroma adquiere una morfología especial. A los lados existe un revestimiento fibroso, formado por células de músculo liso vascular y sobre todo por fibroblastos y colágeno. Dentro hay células espumosas y restos necróticos de células muertas por el proceso inflamatorio (Ross, 1999). También existen grandes acúmulos extracelulares de colesterol, que suelen cristalizar y ser rodeados por macrófagos. Este colesterol parece provenir de las membranas de células muertas, sobre todo de hematíes tras pequeñas hemorragias (Kolodgie et al., 2003). Estas hemorragias también generan depósitos de fibrina.

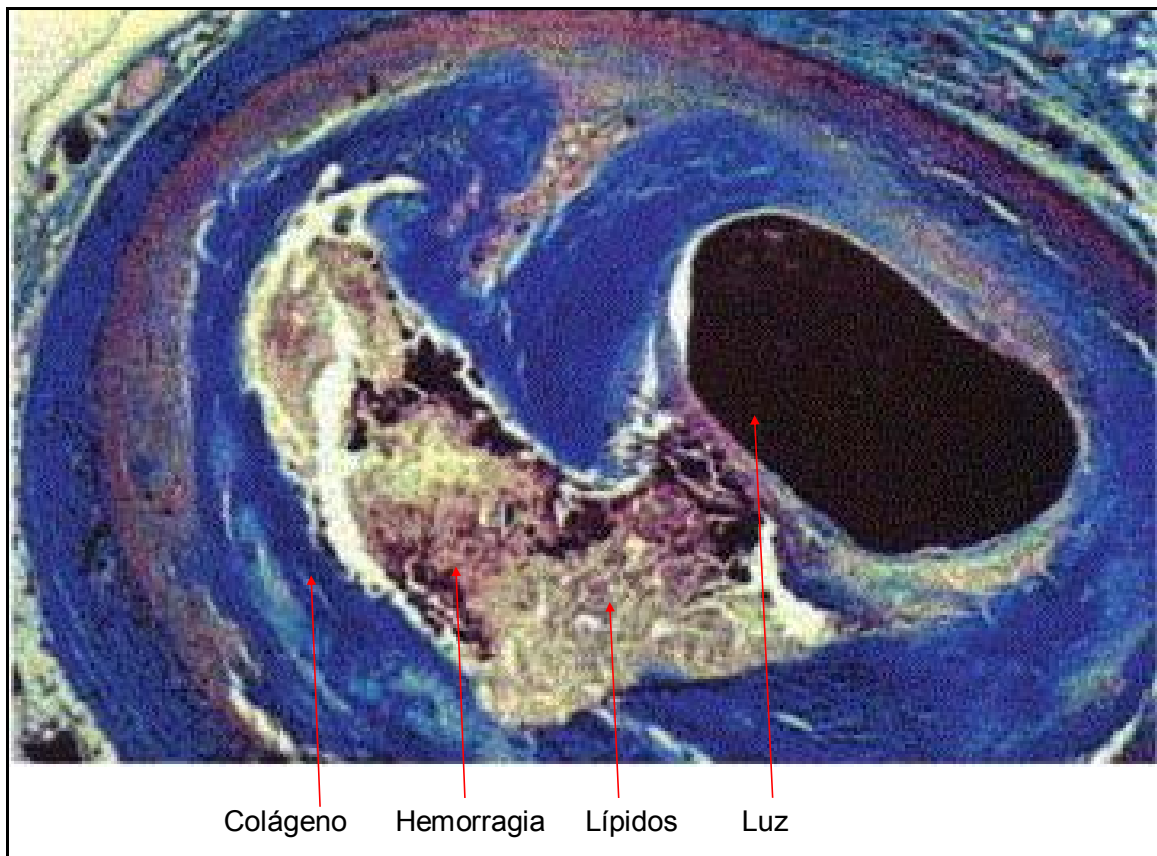


Figura 2: Estructura de una placa de ateroma rota disecada procedente de una necropsia, apreciándose la estructura histológica (Fuster et al., 2005, modificado).

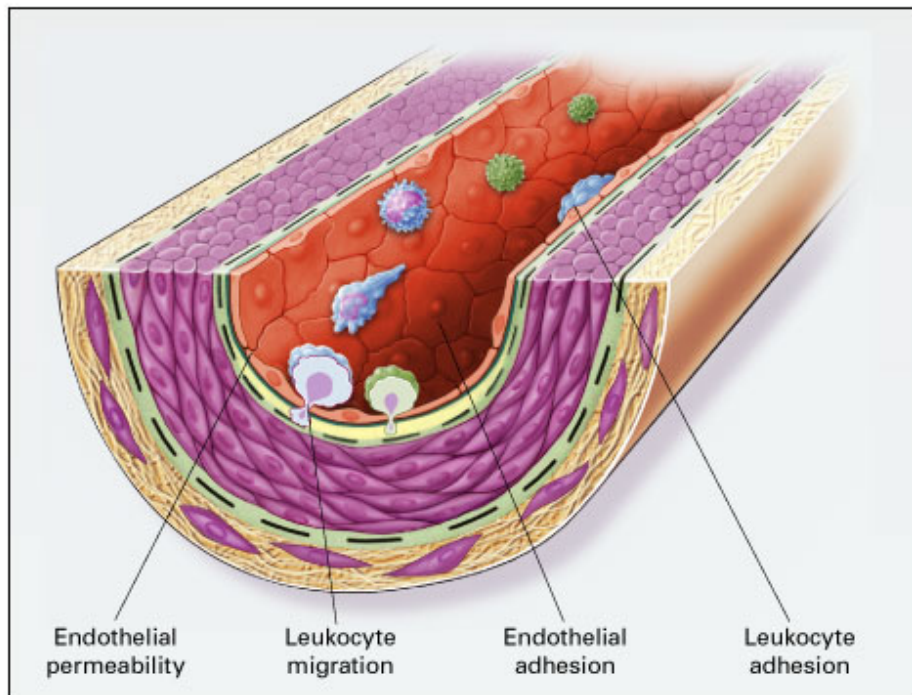
En la placa de ateroma hay por lo tanto una evolución, que dura décadas, marcada por la pugna entre factores estabilizantes y desestabilizantes en la misma.

Entre los factores estabilizantes, pueden destacarse:

- La reparación endotelial (Hristov y Weber, 2006).
- La estabilidad mecánica, que requiere una región de “hombro” con abundante colágeno, poblada por fibroblastos y células de músculo liso vascular (Cipollone et al., 2004).
- El control endógeno de la respuesta inflamatoria, donde incluso algunos macrófagos pueden abandonar la placa y reintegrarse en la sangre (Shah et al., 2001).
- El control del índice proliferación/apoptosis de células de músculo liso vascular (Geng y Libby, 2002).
- El transporte inverso de colesterol, mediado por el colesterol HDL (Shah et al., 2001).
- El control de las hemorragias dentro de la placa, que son un factor desestabilizante relacionado con la neoangiogénesis (“vasa vasorum”) (Fuster et al., 2005).
- La estabilidad de la sangre, tanto hemodinámica como por el mantenimiento de un adecuado control de la coagulación y fibrinólisis (Shah et al., 2001).

Por todo ello, ya que la sangre está tan implicada como la misma placa en el advenimiento de síndromes clínicos de aterosclerosis, se tiende a hablar de “placa de alto riesgo y sangre de alto riesgo” más que de “placa vulnerable” (Fuster et al., 2005).

A



B

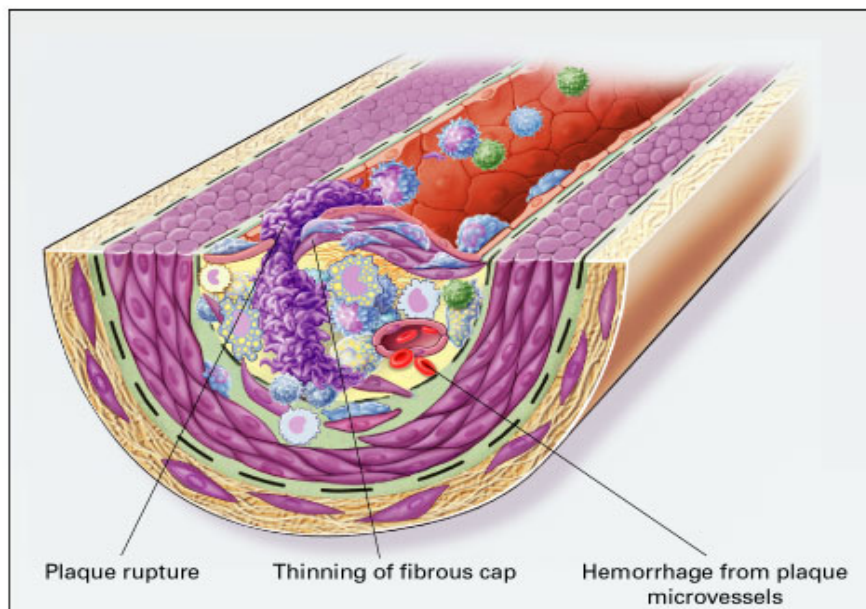


Figura 3 (página anterior): Evolución de la placa de ateroma desde una situación de inestabilidad incipiente a una situación de placa de alto riesgo (Ross, 1999, modificado).

Endothelial permeability: Permeabilidad endotelial

Leukocyte migration: Migración de leucocitos

Endothelial adhesion: Adhesión endotelial

Leukocyte adhesion: Adhesión de leucocitos

Plaque rupture: Ruptura de placa

Thinning of fibrous cap: Adelgazamiento del recubrimiento fibroso

Hemorrhage from plaque microvessels: Hemorragia de microvasos de la placa

1.2.2. Inflamación en el vaso: dimensión molecular

El estudio de los mediadores moleculares en la aterosclerosis es un campo de investigación muy complejo y en constante crecimiento. Así, podemos clasificar las moléculas en varias categorías:

- Moléculas de adhesión. Permiten el contacto y la comunicación célula-célula. Muy importantes en la extravasación de leucocitos y precursores vasculares circulantes. Destacan la selectina, P-CAM, I-CAM, V-CAM, y la familia de las quimiocinas (citoquinas quimiotácticas), donde nombramos el sistema del SDF-CXCR4 (Zernecke et al., 2005).
- Citoquinas y factores de crecimiento. Destacamos el PDGF (importante estímulo mitótico para las células de músculo liso vascular), y el TNF, IL-1, IL-6 y PRC (proteínas reactiva C, de origen hepático) (Moreno y Fuster, 2004). En el control endógeno de la inflamación, parecen estar implicadas tanto el TGF- β (Grainger et al., 2004) como las citoquinas de respuesta Th2, como la IL-10 (Hansson et al., 2002).
- Moléculas de control de la hemostasia. Destacamos el factor tisular, el fibrinógeno, y las moléculas de control de la fibrinólisis tPA y PAI-1. La inflamación tisular de la placa, y la inflamación generalizada de la sangre, produce un estado hemostático caracterizado por la hipercoagulabilidad y la antifibrinólisis (Koh et al., 2004). Todo ello facilita la trombosis y el advenimiento de isquemia en la región distal a la lesión.

- Enzimas. Parecen ser importantes las ciclooxigenasas: COX-1 en las plaquetas (Awtry y Loscalzo, 2000), y COX-2 en células inflamatorias y de músculo liso vascular (Cipollone et al., 2004); también destacan las MMP o metaloproteasas de matriz (que sirven para el remodelado de la sustancia intercelular). Las MMP parecen ser importantes tanto en la migración de las VSMC a través de la lámina elástica interna (Newby, 2005), como en la inestabilidad de la placa (Johnson et al., 2005).

1.2.3. La aterosclerosis como inflamación sistémica

De todo lo anterior puede deducirse que la aterosclerosis es una enfermedad diseminada. Entre los órganos implicados, además de los vasos sanguíneos donde se asiente la lesión, podemos enumerar:

- Los vasos sanguíneos no ocluidos. Investigaciones recientes detectan alteraciones en segmentos vasculares de pacientes ateroscleróticos donde todavía no se han asentado lesiones de ese tipo (Ruiz et al., 2006).
- La sangre. Como vehículo de citoquinas y células, así como factor hemodinámico y hemostático (Moreno y Fuster, 2004).
- La médula ósea. Como “cantera” de células inmunológico-inflamatorias de origen hemático (Hristov y Weber, 2006).

- El hígado. Como secretor de factores de coagulación y el complemento, como la PRC, así como regulador de los niveles de lipoproteínas plasmáticas (Hanley et al., 2005).
- El tejido adiposo. Sobre todo los adipositos del tejido adiposo abdominal, que pueden secretar adipoquinas (citoquinas de origen adiposo): IL-1 y TNF. De ahí que la obesidad central se relacione con el riesgo cardiovascular (Eckel et al., 2005).

1.3. Precursores vasculares de origen hemático en la aterosclerosis

1.3.1. Antecedentes

Es muy conocida la teoría de la aterosclerosis como respuesta inflamatoria local del vaso a un estímulo inflamatorio *in situ*, destacando los estímulos inflamatorios de naturaleza lipídica (Ross, 1999).

En los años 70 del s. XX, Benditt y su equipo demostraron el origen monoclonal de las lesiones ateroscleróticas en una pequeña serie clínica, sugiriendo con ello la existencia de un paso más que la mera respuesta inflamatoria a la lesión por acúmulo lipídico (Benditt y Benditt, 1973).

Por otro lado, desde hacía tiempo se conocía y aceptaba, en el campo de la investigación en embriología, la existencia del hemangioblasto, un precursor capaz de diferenciarse tanto en células de la sangre como en células que daban

origen a las paredes de los vasos sanguíneos (Choi et al., 1998). En ese momento, se creyó que este mecanismo se limitaba a los embriones.

1.3.2. Células progenitoras endoteliales (EPCs)

En 1997 se publicó un decisivo trabajo que marcó un destacado cambio de paradigma. Se comenzaron a aislar precursores endoteliales en la sangre de animales adultos (Asahara et al., 1997), los cuales se pegaban y parcheaban en las zonas de daño endotelial. De este modo, se comenzó a aceptar que la reparación endotelial en un vaso denudado podía realizarse de dos maneras no excluyentes:

- Angiogénesis, por proliferación y migración de las células vecinas, de una forma local (teoría de la respuesta a la lesión).
- Vasculogénesis, por células precursoras circulantes en la sangre, y cuyo origen es la médula ósea.

La importancia clínica de estos precursores endoteliales circulantes ha quedado demostrada, relacionándose con un perfil cardiovascular más favorable; en concreto, y en pacientes, se ha demostrado que se correlacionan con la función endotelial (Hill et al., 2003); además, estos precursores se ven aumentados con el entrenamiento físico (Laufs et al., 2004), o con fármacos antiateroscleróticos como las estatinas (Landmesser et al., 2004).

Los precursores endoteliales circulantes también se están utilizando como terapia experimental (neovasculogénesis terapéutica), tanto en isquemia

miocárdica (Britten et al., 2003) como en isquemia de miembros inferiores (Tateishi-Yuyama et al., 2002).

1.3.3. Células progenitoras de músculo liso vascular

¿Cuál es la importancia de las células de músculo liso vascular (VSMC) en este contexto? Según la teoría de la respuesta a la lesión, estas células provienen de la media, migrando a través de la lámina elástica interna hacia el espacio subendotelial, donde constituyen la neoíntima tanto en aterosclerosis como en restenosis post-angioplastia. Sin embargo, y en consonancia con los nuevos datos, se han demostrado varios hechos:

En modelos animales de proliferación neointimal tras lesión endotelial con balón, la mayoría de las células de músculo liso vascular que constituyen la neoíntima tienen su origen en la médula ósea (Sata et al., 2002). En aterosclerosis humana, también se ha demostrado este origen en células de músculo liso vascular que forman parte de la lesión (Caplice et al., 2003).

Se han aislado precursores angiogénicos circulantes en la sangre, cuyo origen es la médula ósea, y que pueden diferenciarse *in vitro* hacia células de fenotipo endotelial o de músculo liso vascular según las condiciones controladas de cultivo (Simper et al., 2002). Esta diferenciación puede verse afectada por fármacos. La pioglitazona ha demostrado, *in vitro*, la capacidad de diferenciar estos precursores hacia el linaje endotelial (Wang et al., 2004).

Es posible que esta heterogeneidad de la población de células de músculo liso vascular en la placa de ateroma explique los hallazgos de poblaciones con mutaciones en el receptor de TGF- β , que anulan los efectos antiproliferativos y

proapoptóticos que normalmente presenta esta citoquina en este grupo de células (McCaffrey et al., 1997). Sin embargo, dicha mutación no ha sido encontrada en otras series (Clark et al., 2001).

2. EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-B) EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

2.1. Introducción

En 1980 se describieron los efectos celulares de un grupo de moléculas a las que se llamó “factores de crecimiento transformantes” (en sus siglas inglesas, TGF), debido a su capacidad de transformar un cultivo celular de fibroblastos hacia una línea celular con características parecidas a las líneas tumorales (Todaro et al., 1980). Se demostró posteriormente que había dos grandes clases de TGF, el TGF- α y el grupo de los TGF- β , con diferentes isotipos, entre los que destaca el TGF- β 1 (Blobe et al., 2000).

Los efectos del TGF- β son muy complejos y dependen del tipo y del contexto celular. Sin embargo, el efecto que más llamó desde el principio la atención de la comunidad científica fue su capacidad de disminuir la proliferación celular en muchos tipos celulares, incluyendo células tumorales. Muchas otras funciones celulares se han asociado al TGF- β . Entre ellas destacan la activación de la apoptosis, regulación de la contracción del citoesqueleto, influencia en la diferenciación y estímulo en la síntesis de matriz extracelular (Massagué et al., 2000).

Debido a la complejidad del proceso aterosclerótico, donde se encuentran alteradas muchas funciones celulares en las que el TGF- β se halla implicado, no resulta sorprendente la multitud de relaciones que se han investigado entre esta citoquina y las enfermedades cardiovasculares (Grainger et al., 2004). Su papel por lo tanto, se ha convertido en un importante determinante de nuestro

grado de comprensión de las bases patológicas de esos desórdenes. Sin embargo, a pesar de los asombrosos avances que se han producido en los últimos años en el conocimiento de la compleja regulación del TGF- β en estas enfermedades, esta información no se ha transferido en forma de beneficios clínicos directos. El punto clave a determinar, por lo tanto, parece ser el estudio del TGF- β como diana farmacológica (Redondo et al., 2007).

2.1.1. Regulación de la transducción de la señal

La proteína TGF- β se sintetiza como un prepropéptido cuya estructura primaria consiste en una cadena de 390 aminoácidos (44.3 KDa). Cuando se secreta, este péptido se corta por su extremo C-terminal. De esta manera, se obtienen dos cadenas peptídicas (N-terminal o TGF- β 1 activo y C-terminal o péptido asociado a latencia), que permanecen unidas por uniones no covalentes. Cuando el TGF- β es liberado de dicho péptido asociado a latencia, puede unirse al sistema de receptores (Piek et al., 1999).

Los complejos y variados efectos del TGF- β tienen lugar a través de un complejo sistema de transducción de su señal. El sistema de señalización que ha sido más estudiado y descrito comienza con la unión del TGF- β 1 activo a un receptor llamado TGF- β -R-II (Shi y Massagué, 2000), dependiendo por tanto la señal de la población de este tipo de receptores en la membrana celular, y este parámetro puede ser importante en la regulación de la respuesta al TGF- β 1. En líneas celulares de intestino, por ejemplo, la expresión génica de TGF- β -R-II puede verse disminuida en respuesta a varios estímulos de inflamación celular, como la proteína kinasa C (PKC) y la ciclooxygenasa 2 (COX-2) (Wu et al.,

2003). En células de músculo liso vascular (VSMC), se ha descrito asimismo que este efecto puede producirse en cultivos de VSMC en respuesta a la depleción de TGF- β (Grainger et al., 2004). Esto se correlacionaría con el hallazgo clínico de una menor expresión de TGF- β -R-II en vasos ateroscleróticos (McCaffrey et al., 1999). De la misma manera, parece existir una regulación en la localización de este receptor en la membrana, pues el complejo de receptores puede internalizarse, aunque si lo realiza a través de vesículas revestidas por clatrina o por caveolas es un tema aún sujeto a controversia (Di Guglielmo et al., 2003).

Este receptor TGF- β -R-II, activado por el ligando, es capaz entonces de ser unido al receptor TGF- β -R-I, del que han caracterizado diversos subtipos llamados ALKs (quinasas dependientes de activina). Esta actividad kinasa fosforila igualmente a las proteínas señalizadoras Smads (destacando la Smad2 y la Smad3), las cuales forman un hetero-oligómero con la proteína Smad4 (Ten Dije y Hill, 2004). El complejo resultante se desplaza hacia el núcleo, donde regula la expresión génica. Las Smads 6 y 7 se conocen como Smads inhibitoras, pues anulan este traslado al núcleo mediante una inhibición competitiva con otras Smads, en el sitio de la acción de la ALK (Ten dijke et al., 2004).

Respecto a las Smads2/3, a priori resultaría sorprendente que la Naturaleza utilizara dos moléculas diferentes para realizar exactamente una misma función. De acuerdo a este concepto, se han descrito algunas diferencias en el papel de la Smad2 y la Smad3 en VSMC (Redondo et al., 2005). Aunque estas dos moléculas presentan un alto grado de homología, sus funciones moleculares parecen ser profundamente diferentes. La Smad2, al contrario que la Smad3, es

incapaz de unirse directamente al DNA, debido a una secuencia (exon3) que evita esta interacción molecular. Interesantemente, se ha descrito la existencia de una variante de Smad2 que se comporta en este aspecto como la Smad3 (Yagi et al., 1999).

Los especiales efectos del TGF- β 1 sobre células endoteliales (puede ser angiogénico o antiangiogénico), tienen su correlato molecular a través de una regulación específica de la señalización. En este tipo celular, bajas concentraciones de TGF- β 1 estimulan la isoforma ALK-1, que induce la fosforilación de las Smads 1/5/8, lo que origina un aumento de la proliferación y migración celular. Por el contrario, altas concentraciones de TGF- β 1 estimulan las isoformas ALK-4/5/7, las cuales a su vez fosforilan y activan las Smads2/3, con el efecto celular de una inhibición de la proliferación y migración. La relación estequiométrica más aceptada para estos efectos incluye, como mínimo, un heterotetrámero: dos TGF-R-II y dos TGF-R-I (Lebrin et al., 2005). Específicamente, estos dos TGF-R-I pueden ser ALK-5/ALK-1 para la vía dependiente de ALK-1 o dos ALK-5 para la vía dependiente de esa kinasa. La transición de la vía de ALK-4/5/7 a la de la ALK-1 parece estar modulada por el receptor accesorio endoglin o CD105 (Lebrin et al., 2004). La vía de ALK-1→Smads1/5/8 parece ser específica a las células de linaje endotelial.

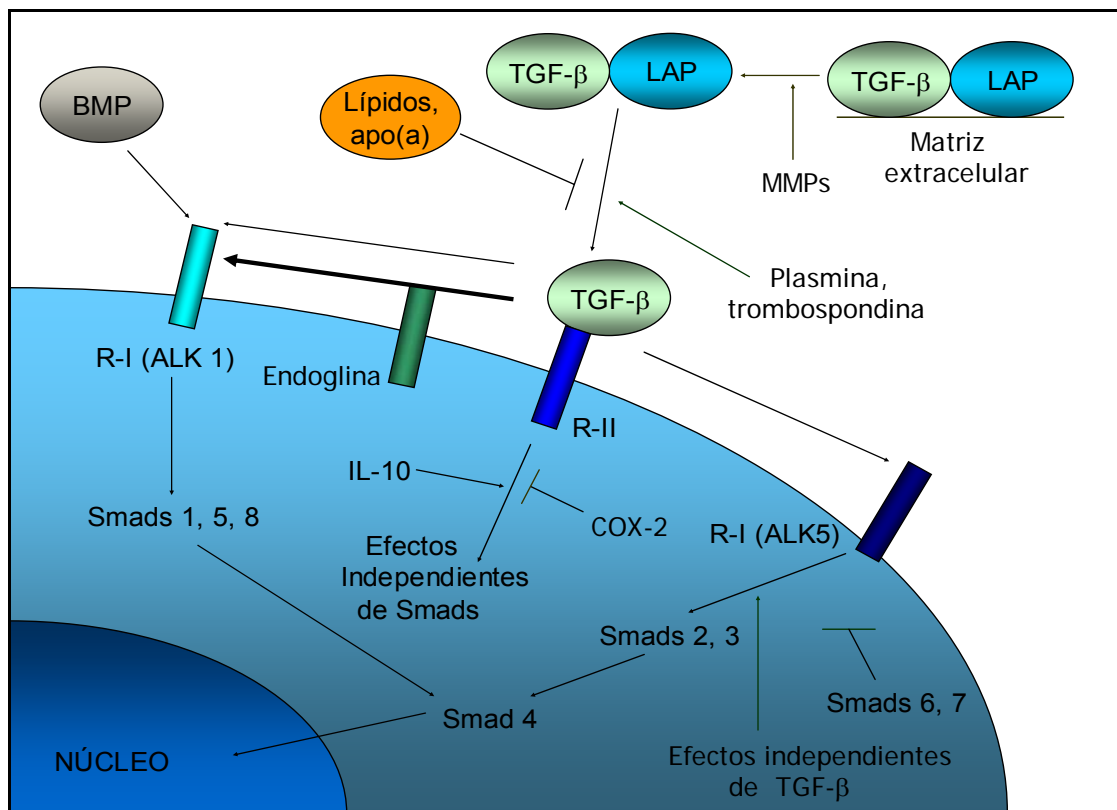


Figura 4: Representación esquemática de la señalización celular del TGF- β (Redondo et al., 2007, modificado).

BMP: Proteínas morfogénicas del hueso

ALK: Kinasas relacionadas con la activina

R: Receptor

LAP: Péptido asociado a latencia

COX-2: Ciclooxygenasa 2

IL-10: Interleuquina 10

MMPs: Metaloproteasas de matriz

2.1.2. Comunicaciones entre la vía del TGF- β 1 y otras vías de señalización

Algunos hallazgos recientes se están añadiendo a esta vía clásica de TGF- β 1 y Smads. Se ha visto que el TGF- β es capaz asimismo de activar otros sistemas de transmisión de señales, como las proteínas MAP kinasas ERK y p38 (Kamraju et al., 2005). La fosforilación de la MAP kinasa p38 parece ser importante en el efecto antiproliferativo de TGF- β 1 sobre VSMC (Deay et al., 2005). De la misma manera, también se ha descrito la importancia de la fosforilación y reclutamiento nuclear de la proteína ROCK p160 en el efecto inhibitorio de esta citoquina en la línea celular NIH 3T3, siendo este efecto antiproliferativo revertido por inhibidores de Rho kinasa (Bhowmick et al., 2003). También se ha descrito la capacidad del TGF- β 1 de activar la permeabilidad celular al Ca^{2+} mediada por receptores de inositol IP3 (McGowan et al., 2002). Y, finalmente, las dos MAP kinasas ERK y p38 han sido relacionadas con el remodelado del citoesqueleto mediado por el TGF- β 1 (Bakin et al., 2004).

Sin embargo, en este punto podría plantearse la cuestión de si, al igual que el TGF- β 1 es capaz de alterar la función del citoesqueleto, es capaz este último de modular a su vez la respuesta celular a la citoquina que nos ocupa. Resultan cada vez más investigadas las interrelaciones entre el citoesqueleto y la arquitectura tisular con la regulación del ciclo celular, así como la muerte, supervivencia y diferenciación celular (Besson et al., 2005).

Se conoce desde los años 80 que los efectos antiproliferativos del TGF- β 1 en VSMC de aorta de rata sólo tienen lugar cuando las células son cultivadas a una baja densidad (Goodman et al., 1999). Este efecto dependiente la confluencia también se ha descrito en la regulación de la diferenciación mediada por el TGF- β 1 (Zhu et al., 2004).

Debe aclararse que los efectos del TGF- β 1 sobre el citoesqueleto son complementarios a la regulación de sus vías de señalización intracelular. Las moléculas de señalización intracelular no flotan a la deriva en el citosol, al contrario, están unidas al citoesqueleto, y esta unión regula su localización intracelular y, por ende, determina su función de una forma instantánea, en tiempo real. De acuerdo con este concepto, el cociente nuclear/citoplasmático de las Smads se correlaciona con la señalización en membrana de TGF- β 1 de una forma más exacta que la cantidad total, en su forma simple o fosforilada, de las Smads (Ten Dijke y Hill, 2004). Resulta interesante el que, en células cancerosas, se ha descrito que las Smads se encuentran adheridas a los microtúbulos, activándose cuando estas estructuras se despolimerizan (Dong et al., 2000).

Existe además una creciente evidencia sobre la existencia de algunas activaciones de las Smads que son independientes del TGF- β 1, como las que realizan las proteínas de la familia de las MAP kinasas (Engel et al., 1999).

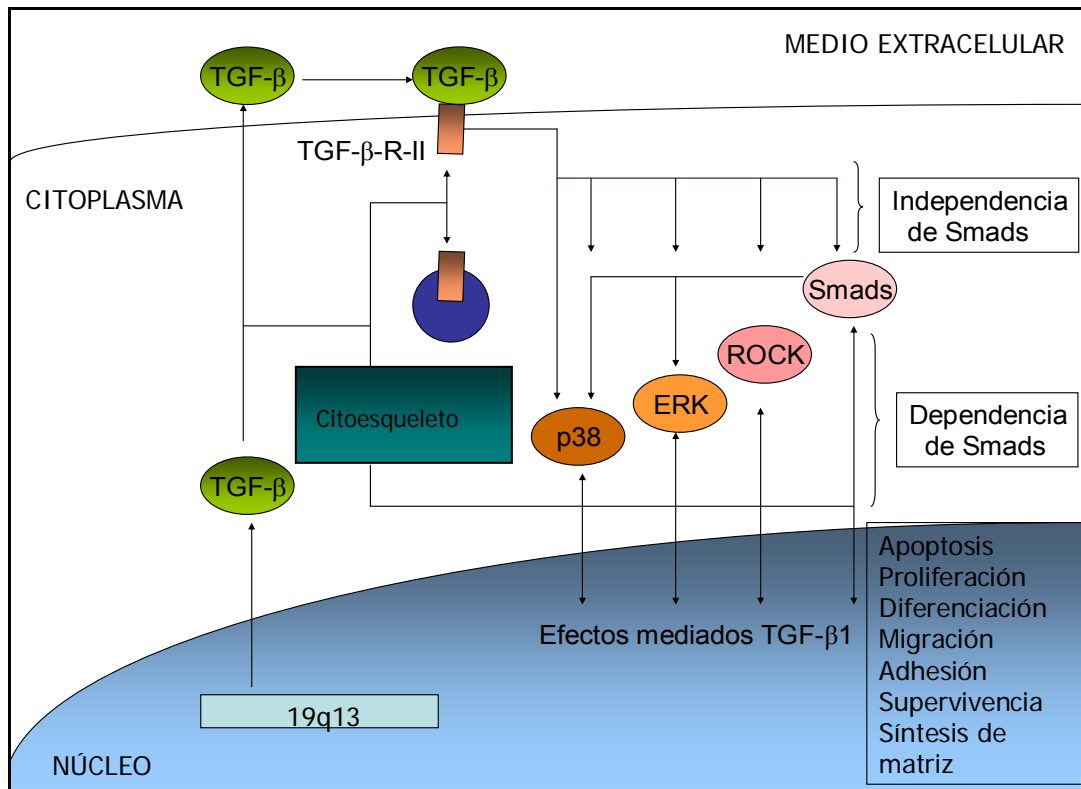


Figura 5: Interrelación del TGF- β con otras vías de señalización intracelular (Redondo et al., 2007 modificado).

P38: Proteína asociada a mitógenos de 38 KDa.

ERK: Proteína asociada a mitógenos relacionada con estímulo extracelular

ROCK: Proteína kinasa de la proteína Rho

2.2. Papel del TGF- β 1 en aterosclerosis

2.2.1. Evidencias para un papel antiaterogénico del TGF- β 1

El TGF- β 1 ha sido considerado como una citoquina protectora frente a la aterosclerosis, siendo este papel antiaterogénico revisado por Grainger (Grainger et al., 2004). De acuerdo con esta teoría, el TGF- β 1 realizaría su papel ateroprotector a varios niveles: control de la proliferación de células vasculares, mantenimiento de una correcta diferenciación celular, e incremento en la estabilidad de la placa. Otro rasgo protector del TGF- β radicaría en su capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria (Mallat y Tedgui, 2002).

Todos estos efectos celulares fueron inicialmente postulados por extrapolaciones de resultados obtenidos en modelos de cultivo celular. Sin embargo, investigaciones adicionales sustentaron este modelo protector.

En aterosclerosis humana se ha observado una menor activación de TGF- β 1. Un importante factor para bloquear la activación de TGF- β 1 en los vasos sanguíneos parece ser la apolipoproteína (a) (Grainger et al., 1995). De hecho, la relación entre lipemia y la menor activación de TGF- β 1 se subraya por el hallazgo de una reducida biodisponibilidad de TGF- β 1 activo tras una comida rica en grasas (O'Neil et al., 2004). Asimismo, la menor activación de TGF- β se ha relacionado con una disminución del cociente fibrinólisis/antifibrinólisis (Byrne et al., 1998).

Además de una reducida biodisponibilidad, en las placas de ateroma se ha observado una menor señalización por Smads 2 y 3 (Kalinina et al., 2004). El estrés de cizallamiento también ha sido identificado como un factor capaz de

interferir esta señalización, mediante la inducción de un aumento en la expresión de las Smads inhibitorias 6 y 7 (Topper et al., 1997).

Además de estos hechos, se ha descrito una disminución del ratio TGF- β -RII/RI en las placas de ateroma (McCaffrey et al., 1995). Incluso se han llegado a notificar mutaciones microsatélites del gen de TGF- β -RII en pacientes ateroscleróticos (McCaffrey et al., 1997), aunque esta observación no se ha repetido en otras series anatomopatológicas (Clark et al., 2001).

Todos estos indicios asociativos fueron seguidos por experimentos en los que un enfoque de inhibición demostrara una relación de causa y consecuencia.

Se alcanzaron resultados positivos. En modelos experimentales de ratones sin gen de apo-E, se demostró que la aterosclerosis se aceleraba cuando se trataba a los animales con anticuerpos neutralizantes de TGF- β (Mallat et al., 2001). De manera análoga, cuando el mismo modelo animal fue tratado con receptores solubles, las lesiones se hicieron más frágiles (Lutgens et al., 2002).

2.2.2. Un papel patogénico para el TGF- β 1

En aparente contraste con los efectos protectores descritos anteriormente, se ha comprobado que la expresión de TGF- β 1 puede ser inducida *in vitro* por diversos estímulos aterogénicos como el estrés de cizallamiento (Negishi et al., 2001), el colesterol oxidado (Leonarduzzi et al., 2001), la angiotensina II (Redondo et al., 2006), o factores de crecimiento como el PDGF (Redondo et al., 2003). Al mismo tiempo, sin embargo, esta expresión del TGF- β 1 se ha asociado con la estabilidad de las placas carotídeas y la subsiguiente protección frente a los accidentes cerebrovasculares (Cipollone et al., 2004).

Sin embargo, parece claro que el establecimiento de una relación de causalidad requerirá el diseño de experimentos basados en el uso de la tecnología antisentido, como se discutirá más adelante.

Un incremento en la expresión de TGF- β 1 se encuentra también en piezas anatomopatológicas de placas de ateroma (Panutsopulos et al., 2005). Al mismo tiempo, los niveles de TGF- β 1 se correlacionan con la aterosclerosis avanzada (Wang et al., 1998), y el uso de plasma pobre en plaquetas en estas determinaciones descarta una contaminación por TGF- β 1 secretado por las plaquetas. Los niveles sanguíneos de TGF- β 1 también se correlacionan con la hipertensión con daño en órganos diana en algunas series clínicas (Laviades et al., 2000). La correlación con la hipertensión no está aún claramente demostrada (Lijnen et al., 2003).

La evidencia de un papel patogénico del TGF- β 1 se hace dramáticamente clara en el caso de las restenosis post-angioplastia. En esta situación, donde la homeostasis tisular normal está mal regulada, el TGF- β 1 se considera claramente un factor pro-restenótico (Chung et al., 2002), cuyos niveles sanguíneos están elevados en angioplastia coronaria porcina (Chamberlain et al., 2001). Por todo esto, el TGF- β 1 puede ser considerado como un factor netamente patológico en restenosis post-angioplastia. Experimentos de antagonismo *in vivo* en modelos animales sostienen esta idea en varios estudios independientes. La inhibición del TGF- β por inyección de receptor soluble en ratas (Smith et al., 1999), y mediante un adenovirus para receptor soluble en ratones (Kingston et al., 2001), han demostrado un efecto inhibitorio en el crecimiento neointimal tras la herida por balón. Del mismo modo, la puerta está abierta para evaluar la importancia del TGF- β 1 como marcador de pacientes de alto riesgo entre los candidatos a angioplastia.

En la restenosis post-angioplastia tiene lugar un importante daño endotelial. Un mecanismo decisivo para mantener una adecuada reparación vascular endógena parece ser el mantenimiento de una adecuada función de las células progenitoras endoteliales (Hristov y Weber, 2006). Los efectos del TGF- β 1 en las células progenitoras endoteliales parecen tener lugar de un modo bifásico. Bajas concentraciones han sido relacionadas con un incremento en el número de células progenitoras endoteliales, un efecto inhibido por concentraciones más altas (Henrich et al., 2004). Sin embargo, debe destacarse que aún falta mucho por conocer en las vías de señalización del TGF- β 1 en este tipo de células.

2.2.3. TGF- β 1: la espada de doble filo

Como se ha explicado más arriba, el TGF- β 1 parece perder su efecto protector e incluso adquirir un papel patogénico a lo largo de la evolución crónica de la enfermedad cardiovascular. Los determinantes de esta traslocación patológica son objeto de un intenso estudio.

Uno de los más importantes reguladores de la respuesta al TGF- β 1 parece ser la misma biodisponibilidad de TGF- β 1. Factores de riesgo cardiovascular como el antifibrinolítico PAI-1 o una comida rica en grasas han sido relacionados con el secuestro del TGF- β 1 activo. Como se postula (Annes et al., 2003), la biodisponibilidad del TGF- β 1 activo es un importante paso en su regulación que no debe ser obviado.

La biodisponibilidad del TGF- β 1 también puede verse afectada por la regulación de su secreción. Aunque aún se conoce muy poco sobre la regulación de su

tráfico intracelular, se ha descrito que el TGF- β 1 puede sintetizarse y permanecer localizado de forma intracelular en VSMC de rata en respuesta a concentraciones altas de glucosa (Lindschau et al., 2003). Un interesante fenómeno intracelular parece tener lugar en las células de plasmacitoma, donde el TGF- β 1 puede unirse a una fracción de TGF- β -R-II localizado de forma intracelular, inhibiendo de este modo su localización y señalización normal en la membrana (Fernandez et al., 2004). Este hallazgo, sin embargo, no ha sido aún hallado en modelos celulares vasculares.

La importancia médica de un conocimiento comprensivo de la regulación del tráfico intracelular del TGF- β 1 se pone de manifiesto con dos diferentes estudios clínicos que describen una asociación positiva entre los polimorfismos del péptido señal de TGF- β 1 y la frecuencia de infarto de miocardio en pacientes europeos (Cambien et al., 1996) y japoneses (Yokota et al., 2002). Estos polimorfismos, sin embargo, no se asociaron con estenosis angiográfica. No obstante, es necesario recordar los límites de la angiografía para el estudio del tamaño de las lesiones ateroscleróticas, debido a que un importante crecimiento extrínseco puede tener lugar en ausencia de obstrucción de la luz (Fayad et al., 2002).

Sin embargo, entender la enfermedad cardiovascular como una mera falta de biodisponibilidad del TGF- β 1 parece demasiado simplista. Como se ha comentado con anterioridad, la regulación en la transmisión de la señal es un evento clave en la respuesta a TGF- β 1, que a su vez puede verse afectado por mediadores de inflamación y aterosclerosis. Los efectos clave parecen estar relacionados con una disminución en la función de las Smads (Kalinina et al.,

2004), así como en una menor expresión membranosa de TGF- β -R-II (McCaffrey et al., 1995).

En VSMC en cultivo, así como en piezas anatomopatológicas de vasos enteros, se ha descrito la disminución del ratio TGF- β -R-II/R-I como un evento crucial en la transición de los efectos del TGF- β 1 desde la inhibición de la proliferación y el estímulo de la diferenciación (fenotipo contráctil), hacia la estimulación de la matriz extracelular (fenotipo sintético) (Grainger et al., 2004). Este modelo, sin embargo, no incluiría una relación estequiométrica fija de dos TGF- β -R-II y dos R-I (Lebrin et al., 2005).

La relación entre la biodisponibilidad y la señalización de TGF- β 1 es digna de atención. La hipótesis de la citoquina protectora estipula la existencia de un ciclo positivo entre la generosa disponibilidad de TGF- β 1 en el medio y el mantenimiento de un cociente elevado en la expresión de TGF- β -R-II/R-I en los modelos de VSMC en cultivo (Grainger et al., 2004). Esto mantendría el fenotipo diferenciado (contráctil), y controlaría la proliferación celular. Al mismo tiempo, evitaría la excesiva síntesis de matriz extracelular.

Este modelo está basado en modelos de cultivo celular *in vitro*, y por la tanto no explica el hallazgo de unos mayores niveles y a la vez de una señal patológica de TGF- β 1 en aterosclerosis avanzada, restenosis e hipertensión con remodelado vascular y daño en órganos diana. ¿Qué factor externo puede ser responsable *in vivo* de esta sobrecarga de TGF- β 1? Uno de los candidatos más probables pueden ser el número y la actividad plaquetaria. Las plaquetas contienen una gran cantidad de TGF- β 1 activo en sus gránulos de secreción (Blobe et al., 2005). La sobrecarga por citoquinas de origen plaquetario parece ser importante en aterosclerosis. El efecto aterosclerótico de las plaquetas es

un evento ampliamente aceptado, como se ha revisado recientemente (Weber, 2005).

Una sobrecarga de TGF- β 1 sería patogénica, especialmente si la señalización ya se encuentra alterada. Una transición de ALK-1 hacia ALK-5 se ha demostrado como un efecto importante en la modulación de los efectos TGF- β 1 de una forma dependiente de la dosis (Lebrin et al., 2004). Por otro lado, en líneas celulares intestinales se ha descrito la existencia de un proceso de tolerancia hacia el TGF- β 1 (Sheng et al., 1999). No obstante, aún no se ha demostrado que este fenómeno tenga lugar en modelos vasculares.

Otro efecto importante en la modulación del TGF- β 1, que probablemente actúa en la enfermedad cardiovascular avanzada, es la confluencia celular. Sobre todo en restenosis, donde las VSMC neointimales crecen en una compacta microarquitectura (Farb et al., 2004), una densidad celular elevada podría mediar los efectos patogénicos del TGF- β 1.

2.3. TGF- β en otras enfermedades vasculares

Dos enfermedades raras se han relacionado fuertemente con una mala regulación en la función del TGF- β . La telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad de Rendu-Weber-Osler), es una enfermedad autonómica dominante caracterizada por la formación de capilares frágiles por todo el cuerpo, incluyendo la piel, mucosas y órganos internos (Lebrin et al., 2005). Se han descrito dos variantes: la de tipo 1 (con mutaciones en el gen de la endoglin), y la de tipo 2 (con mutaciones en el gen que codifica para la ALK-1) (Seki et al., 2004).

La hipertensión pulmonar primaria, en sus variantes hereditaria y esporádica, se ha relacionado con mutaciones en el receptor II de proteínas morfogénicas del hueso, que es un miembro de la superfamilia de receptores de TGF- β (Sugiyama et al., 2004). La obstrucción luminal que se produce en dicha enfermedad está causada por un crecimiento anormal de VSMC. Curiosamente, en VSMC de arterias pulmonares provenientes de estos pacientes, se ha descrito que el TGF- β 1 estimula la hiperplasia en lugar de inhibirla (Morrell et al., 2001).

2.4. TGF- β y el corazón

La hipertrofia y fibrosis cardíaca se ha relacionado con el TGF- β 1. Se ha descrito una estrecha relación en el corazón entre el TGF- β 1, el sistema renina-angiotensina y el sistema adrenérgico local (Rosenkranz, 2004).

Los efectos profibróticos del TGF- β 1 en el corazón tienen lugar a diversos niveles. El TGF- β 1 incrementa la síntesis de matriz extracelular, mientras que decrece la actividad de las metaloproteasas de matriz (Yuan y Varga, 2001). De forma adicional, estimula la síntesis de colágeno (Alexakis et al., 2005).

¿Son estas adaptaciones un fenómeno patogénico o compensador? Un incremento de la función del TGF- β 1 se ha relacionado con la hipertrofia cardíaca, cicatriz post-infarto e insuficiencia cardíaca. En estas situaciones, un incremento en este remodelado cardíaco puede contemplarse como la respuesta a un estímulo de estrés, aunque esta adaptación puede finalmente conducir a una disminución, evidentemente patológica, de la fracción de eyección (Hein et al., 2003).

El TGF- β 1 cardíaco puede considerarse como una potencial herramienta para la monitorización de la hipertrofia cardíaca. Su expresión puede inhibirse por algunos fármacos cardiovasculares como los inhibidores del enzima de conversión de angiotensina o los del receptor AT1 de la angiotensina (Yoshida et al., 2004). Del mismo modo, la señalización por TGF- β 1 se la relacionado con el remodelado cardíaco. Se ha demostrado una intensa señalización por Smads en cicatrices post-infarto (Wang et al., 2002).

Más allá de estas correlaciones, el uso experimental de inhibidores de TGF- β 1 ha demostrado en varios estudios independientes una relación de causalidad

entre la señalización por TGF- β 1 y el remodelado cardiaco. Tanto el uso de anticuerpos bloqueantes bajo sobrecarga de presión (Kuwahara et al., 2003), como la utilización de la terapia génica post-infarto (Okada et al., 2005), han demostrado disminuir la hipertrofia cardiaca en modelos animales.

Estos hallazgos estarían de acuerdo con una relación causa-efecto, en forma de secreción paracrina y/o endocrina de TGF- β 1. La importancia del TGF- β 1 en el corazón se puso de relieve mas aún con un estudio donde no se encontró hipertrofia cardiaca en un modelo con el gen anulado de TGF- β 1 (TGF- β 1 $-/-$), en respuesta a dosis sub-hipertensivas de angiotensina II. La hipertrofia sí se halló en el grupo control (Schultz et al., 2002).

Por todas estas razones, la vía del TGF- β 1 puede ser considerada como un importante marcador y diana farmacológica en la lucha contra el remodelado cardiaco.

2.5. Farmacología del TGF- β 1

Existe una clara relación entre el sistema del TGF- β 1 y varias enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis. La modulación de la vía del TGF- β 1 mediante fármacos diseñados específicamente para esa diana proporcionaría no sólo una fuente de conocimiento en su regulación sino que además abriría una esperanzadora puerta para futuras intervenciones terapéuticas (Yingling et al., 2004). Por otro lado, la multiplicidad de relaciones entre la vía del TGF- β 1 y otras muchas vías reguladoras del sistema cardiovascular convierten a este sistema en una candidato razonable a ser modulado por fármacos cardiovasculares actualmente en uso.

2.5.1. Modulación por moléculas diseñadas hacia esa diana

Algunos fármacos han sido específicamente creados para modular el sistema del TGF- β . Se ha descrito que la inyección de anticuerpos bloqueadores de TGF- β (Mallat et al., 2001), o receptor soluble (Lutgens et al., 2002), promueve la inflamación de la placa y aumenta el contenido lipídico en ratones deficientes de apo-E). Al mismo tiempo, en modelos animales de restenosis se han demostrado los efectos protectores (Smith et al., 1999) tanto del receptor soluble (Kingston et al., 2001) como de la transfección con adenovirus de receptor II secretable.

Los anticuerpos contra el TGF- β , como el GC-1008 (pan-específico para todas las isoformas), metelimumab (anti-TGF- β 1) o ledermimumab (anti-TGF- β 2) están en estudio para el tratamiento de la fibrosis pulmonar en ensayos de fase I (Yingling et al., 2004), nefropatía diabética en modelos animales (Benigni et al., 2003), o cicatrización tras cirugía de glaucoma (Mead et al., 2003), respectivamente.

Sin embargo, un enfoque más selectivo incluiría el uso de inhibidores específicos de los subtipos de la ALK. Originalmente desarrollados para la terapia contra el cáncer, estos fármacos se encuentran en ensayo preclínico para el tratamiento de desórdenes fibróticos, como la fibrosis de riñón, hígado y pulmón. Estas moléculas están basadas en estructuras de dihidropirropirazol, imidazol, pirazolopiridina, pirazol, imidazopiridina, triazol, piridompiridina o isotiazol (Yingling et al., 2004). Todos estos bloqueantes de ALK existentes son

inhibidores específicos de la vía ALK-4/5/7-Smad2/3. La aparición de inhibidores selectivos de ALK-1 es esperada con expectación por la comunidad científica, pues podrían tener efectos interesantes en la proliferación endotelial y en la angiogénesis. Sin embargo, como se explicó en el apartado de regulación de la señal, la función de ALK-5 es también necesaria para las vías dependientes de ALK-1 (Lebrin et al., 2005). De acuerdo con este concepto, se ha demostrado que los inhibidores de ALK-5 pueden inhibir el crecimiento de líneas celulares de osteosarcoma (Matsuyama et al., 2003), aunque los efectos de todos estos nuevos fármacos inhibidores de ALK son aún poco conocidos en la angiogénesis.

Otro interesante enfoque se basa en el uso de tecnología antisentido para inhibir la transcripción génica de TGF- β 1, que disminuye, en el laboratorio, el crecimiento de células de glioma cerebral (Fakhrai et al., 1996). Este tipo de inhibición estaría enfocada a bloquear la síntesis de TGF- β 1, en lugar de su liberación. Por lo tanto, es una estrategia con un gran futuro para el estudio de la importancia de las vías intracelulares del TGF- β 1.

Es de esperar que el estudio profundo de esta nueva y emergente arsenal terapéutico rinda, en los años venideros, una importante cantidad y calidad de información sobre la regulación del TGF- β . Del mismo modo, se aclarará su posible valía terapéutica en enfermedades cardiovasculares y de otros tipos.

2.5.2. Modulación por fármacos cardiovasculares tradicionales

Se ha demostrado que varios fármacos ampliamente utilizados en la terapéutica diaria de la enfermedad cardiovascular son capaces de afectar la vía del TGF- β 1.

La aspirina se ha relacionado con el TGF- β 1. Se describió una relación entre el tratamiento con aspirina y la existencia de una mayor activación del TGF- β 1 en sangre (Grainger et al., 1995). La relación de causalidad fue establecida cuando se demostró que el efecto antiproliferativo de la aspirina sobre VSMC era dependiente de esta citoquina, al revertirse cuando se bloqueaba el TGF- β 1 con anticuerpos monoclonales (Redondo et al., 2003).

Otro importante grupo farmacológico relacionado con la función del TGF- β 1 son las estatinas. Se ha demostrado que la pravastatina incrementa los niveles plasmáticos de TGF- β 1 mientras incrementa la síntesis proteica y la secreción del mismo en monocitos (Porreca et al., 2002), lo que podría determinar su función antiinflamatoria e inmunomoduladora.

Esta correlación directa entre la expresión y secreción del TGF- β 1 no se encuentra cuando se estudian otros fármacos. La aspirina, que actúa a través de un lazo autocrino de TGF- β 1, disminuye la expresión de esta citoquina (Redondo et al., 2003). Este efecto inhibitorio de la transcripción de TGF- β 1 se ha encontrado con otros fármacos cardiovascular, como los inhibidores de Rho quinasa (Matsumono et al., 2004) y del enzima de conversión de angiotensina (Rumble et al., 1998). Es de esperar que la creciente investigación sobre esta línea permita en los años venideros elucidar claramente las vías moleculares

implicadas en estos hallazgos, así como la importancia farmacológica de los mismos.

3. DIABETES TIPO 2 Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

3.1. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por la hiperglucemia debida a un defecto en la síntesis de insulina, de su acción periférica, o de ambas. La diabetes mellitus es una enfermedad conocida desde tiempos muy antiguos. En el papiro de Ebers (hallado en 1862 en Luxor), se recoge una sintomatología que recuerda a la diabetes. Los Vedas, extensos relatos de la literatura hindú y una de las cumbres de la literatura universal, describen una forma de orina pegajosa, con sabor a miel y que atrae fuertemente a las hormigas. La medicina india, desde los trabajos de Súsruta (s. IV a.C.) ya distinguía dos formas de diabetes: una que se daba en jóvenes delgados y que no sobrevivían mucho tiempo y otra en personas mayores y obesas, correspondientes a las dos variedades de diabetes mellitus que se siguen distinguiendo hoy (Frank et al., 1957).

Las variedades de la diabetes mellitus son la diabetes tipo 1 y la tipo 2. La de tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas, donde se secreta la insulina, lo que origina un déficit de la misma. La diabetes tipo 2 es 10 veces más frecuente y está aumentando en todo el mundo de forma exponencial (Wild et al., 2004). Su fisiopatología se basa en la resistencia periférica a la acción de la insulina. Hay, por lo tanto, un déficit en su acción, aunque suele cursar con hiperinsulinemia. La patogenia de la diabetes tipo 2

está muy relacionada con la obesidad, que parece producir un “agotamiento” en la acción periférica de la insulina (Eckel et al., 2005).

En la historia natural de la diabetes tipo 2, varios años antes del establecimiento de la enfermedad se produce un estado de intolerancia a la glucosa o prediabetes, que se diagnostica mediante un test de tolerancia a la glucosa. Este estado prediabético es de suma importancia para la prevención de la enfermedad que nos ocupa. Una actuación efectiva en los hábitos de vida (pérdida de peso e incremento del ejercicio físico), puede disminuir la incidencia de diabetes tipo 2 en los 3.2 años siguientes en un 58%, según un estudio clínico de pacientes finlandeses (Tuomilehto et al., 2001). La intervención sobre los hábitos de vida es el doble de efectiva para esta prevención que la profilaxis farmacológica con metformina (Knowler et al., 2002).

Tradicionalmente, por razones históricas, se ha tendido a contemplar la acción de la insulina de una forma que se ha denominado como “glucocéntrica” (Eckel et al., 2005), es decir, centrada en su acción hipoglucémica, descuidando sus efectos sobre el metabolismo lipídico. La insulina es capaz tanto de inhibir la lipólisis del tejido adiposo hacia lipoproteínas ricas en triglicéridos como estimular la lipoproteína lipasa para aumentar la captación de las mismas por los tejidos. Por lo tanto, un defecto en la acción de la insulina se relacionaría con la hipertrigliceridemia. Como describiremos más adelante, la dramática explosión de la epidemia de la tríada enfermedad cardiovascular-diabetes tipo2-síndrome metabólico (Wild et al., 2004), ha motivado la reciente comprensión de la diabetes tipo 2 como una enfermedad en el metabolismo lipídico, en lugar de un desorden localizado solamente en el metabolismo de los hidratos de

carbono (Eckel et al., 2005). De forma paralela, también ha ganado aceptación en los años recientes el concepto de diabetes como enfermedad cardiovascular (Hsueh y Law, 1998). Se ha comprobado que el riesgo coronario de un paciente diabético se asemeja al del sujeto no diabético que haya sufrido un infarto previo (Haffner et al., 1998).

3.2. Diabetes tipo 2 y síndrome metabólico

En los últimos años se está produciendo un espectacular incremento en la incidencia y prevalencia de la morbilidad cardiovascular en todo el mundo. Las estimaciones que se manejan son aún más alarmantes para el futuro, pues establecen que probablemente el problema seguirá aumentando, con un crecimiento aún mayor en los países en vías de desarrollo. Gran parte de este aumento, parece deberse a un cambio en los hábitos de vida, con una tendencia global a una mayor ingesta calórica y consumo de grasas saturadas, unido a una creciente inactividad física en la población global (Wild et al., 2004). La constelación de desórdenes metabólicos que aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular (intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad central, y dislipidemia), unidos a la hipertensión, forman un concepto conocido como síndrome metabólico. Sin embargo, existen diferentes definiciones del mismo, según diferentes criterios de diagnóstico (Eckel et al., 2005).

La obesidad central se relaciona de forma causal con la resistencia a la insulina, pues los adipocitos abdominales secretan adipocinas, que además de estimular

la inflamación cardiovascular y la aterosclerosis, potencian la resistencia a la insulina (Eckel et al., 2005).

Debido a que en la diabetes tipo 2 no existe una adecuada acción de la insulina, parece lógica su relación con el síndrome metabólico. La relación de la diabetes tipo 2 con el síndrome metabólico fue en primer lugar descrita a principios del siglo XX (Kylin, 1920), observándose una asociación de hipertensión, hiperglicemia y gota. Posteriormente (Vague, 1947) se relacionó la adiposidad abdominal con la diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular. Hoy se reconoce ampliamente al síndrome metabólico como un claro factor de riesgo para la adquisición de diabetes tipo 2, y a ambos, síndrome metabólico y diabetes tipo 2, como grandes factores que aceleran la historia natural de la enfermedad cardiovascular.

3.3. La diabetes tipo 2 como enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos (Redondo et al., 2005). Algunas recientes guías clínicas la consideran un riesgo cardiovascular en sí mismo (Klein et al., 2004), y crece, como hemos visto, la tendencia a considerar a la diabetes como una enfermedad cardiovascular (Hsueh y Law, 1998). Es por lo tanto, un hecho aceptado de forma incuestionable que los diabéticos presentan una mayor severidad, celeridad y riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis. La cuestión es si se puede hablar realmente de una variedad de aterosclerosis más severa en los pacientes diabéticos, o bien considerar una enfermedad diferente, la

aterosclerosis diabética. Entre los hallazgos específicos de la aterosclerosis asentada en pacientes diabéticos podemos destacar:

- Los pacientes con diabetes tipo 2 y/o intolerancia a la glucosa presenta de forma típica una afectación aterosclerótica en numerosos vasos coronarios (Kowalska et al., 2001).
- Una menor apoptosis de las células de músculo liso vascular, lo que origina una acumulación de estas células en la media y en la neointima (Ruiz et al., 2006). La apoptosis de células de músculo liso vascular se encuentra disminuida incluso en arterias mamarias internas procedentes de pacientes diabéticos respecto a pacientes ateroscleróticos no diabéticos.
- Una mayor expresión de la proteína proinflamatoria COX-2 en la media de mamarias internas procedentes de pacientes diabéticos respecto a pacientes ateroscleróticos no diabéticos, efecto correlacionado con el índice EUROScore de riesgo en Cirugía Cardíaca (Redondo et al., 2006).

3.4. Fisiopatología del daño vascular en la diabetes tipo 2

Además de las formas especiales que acabamos de contemplar, la mayor frecuencia, celeridad y severidad en el desarrollo de la aterosclerosis en diabéticos se debe a diversos factores.

El más evidente es la coincidencia de factores patogénicos. En la diabetes tipo 2 y en el síndrome metabólico se produce una mala regulación del metabolismo lipídico, que acelera la aterosclerosis (Eckel et al., 2005). También suelen coexistir con obesidad o sobrepeso, el cual también potencia la aterosclerosis de la forma comentada en su correspondiente capítulo.

La hiperglucemia, por sí misma, puede ser también importante como mecanismo multiplicador de la aterosclerosis. Altas concentraciones *in vitro* de glucosa (25 mmol/l) aumentan la expresión de COX-2 en VSMC (Cosentino et al., 2003). En este tipo de células también se ha comprobado que la hiperglucemia puede disminuir su capacidad apoptótica y por tanto asemejar esa inhibición de la apoptosis encontrada en VSMC de pacientes diabéticos.

Este último efecto ha sido observado con concentraciones hiperglucémicas, pero no tan elevadas (15 mmol/l), y más relacionadas con las concentraciones que se encuentran en la sangre de pacientes diabéticos (Ruiz et al., 2006).

Otro mecanismo importante en los pacientes diabéticos como modulador proaterogénico se relaciona con el fenómeno de la glicación avanzada. La glicación es la adición de moléculas de glucosa de forma patológica, por sobrecarga de glucosa en el medio. La concentración sérica de hemoglobina glicada es una adecuada medición de la severidad de la diabetes, con cierto valor retrospectivo y acumulativo, pues esta necesita una hiperglucemia

repetida para tener lugar (Chin et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito la hemoglobina glicada también puede tener efectos vasculares directos, concretamente una hiperplasia de VSMC y una disminución en la capacidad de relajación de los vasos en respuesta al óxido nítrico (Vallejo et al., 2000).

La glicación de las proteínas genera además unas vías bioquímicas patológicas que tienen como resultado la producción de los productos de glicación avanzada (AGE). Los AGE, sobre todo los aductos de proteínas y lípidos están aumentados en los vasos de pacientes diabéticos, así como su receptor (RAGE), lo cual se ha relacionado con la inflamación, el estrés oxidativo y el estímulo protrombótico a nivel local (Kislinger et al., 1999). Más aún, se ha demostrado la inhibición de aterosclerosis en el modelo de ratones sin apo-E a los que se bloquean los receptores de tipo RAGE (Bucciarelli et al., 2002). Los AGE y RAGE se han relacionado con el fenómeno de la “memoria hiperglucémica”, es decir, el mantenimiento del daño en los órganos diana de la diabetes mellitus aunque a partir de entonces se establezca un adecuado y estricto control de la glucemia (Yan et al., 2004). Como tantas observaciones clínicas, este fenómeno tiene su correlato en el laboratorio, donde se encuentra que las VSMC de pacientes diabéticos se siguen comportando como tales aunque se las cultive durante semanas en un medio de cultivo celular con baja glucosa, 5 mmol/l (Ruiz et al., 2006).

4. PIOGLITAZONA EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR DIABÉTICA

4.1. Introducción a las tiazolidinodionas

Las tiazolidinodionas son un reciente grupo farmacológico en el arsenal terapéutico de los hipoglucemiantes orales, usados en el tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2. Son los primeros fármacos antidiabéticos sintetizados con el objetivo de corregir el defecto clave de la diabetes tipo 2: la resistencia a la insulina. Esta síntesis estuvo dirigida al hallazgo de agonistas de los receptores activados por los receptores de peroxisomas de tipo gamma (PPAR- γ).

Los PPAR son un tipo de receptores nucleares que regulan la expresión génica formando un heterodímero con el receptor X retinoide (Yki-Jarvinen, 2004). Su efecto sobre la expresión de determinados genes puede ser de activación o de represión. Se activan en respuesta de ligandos como algunos ácidos grasos, y la deoxi-prostaglandina J2 (dPGJ2). Los tres tipos de PPAR se llaman PPAR- α , PPAR- δ y PPAR- γ .

El PPAR- α se expresa en el hígado, músculo, corazón y pared vascular. Los agonistas de PPAR- α son los hipolipemiantes del grupo farmacológico de los fibratos. Su activación media la función correctora de las dislipidemias que realizan estos medicamentos. Además, parece ser que el agonismo de PPAR- α puede tener un efecto antiinflamatorio (Grau et al., 2005).

El PPAR- δ ha cobrado importancia en los últimos tiempos, ya que algunas investigaciones recientes han relacionado su función en el tejido adiposo y en el

músculo esquelético con una mejor tolerancia a la glucosa y catabolismo lipídico, así como una mayor sensibilidad a la insulina (Muscat et al., 2005).

El PPAR- γ , finalmente, se expresa en el tejido adiposo, las células beta pancreáticas, el endotelio vascular y los macrófagos, así como en las VSMC.

El PPAR- γ tiene un papel importante en la diferenciación de los adipocitos, y también en una correcta captación de ácidos grasos en el tejido adiposo. El efecto principal de las tiazolidinodionas como sensibilizadores de glucosa parece tener lugar precisamente en el tejido adiposo, donde este agonismo de PPAR- γ mejoraría el aclaramiento de ácidos grasos libres, evitando sus efectos perniciosos en el músculo esquelético, el hígado y, probablemente, en las células beta pancreáticas (Yki-Jarvinen, 2004). Además de regular la expresión de genes relacionados con la función de depósito de los adipocitos pueden disminuir en ellos la capacidad inflamatoria y la secreción de adipocinas, así como aumentar la secreción de adiponectina, que es una hormona que aumenta la sensibilidad a la insulina (Eckel et al., 2005).

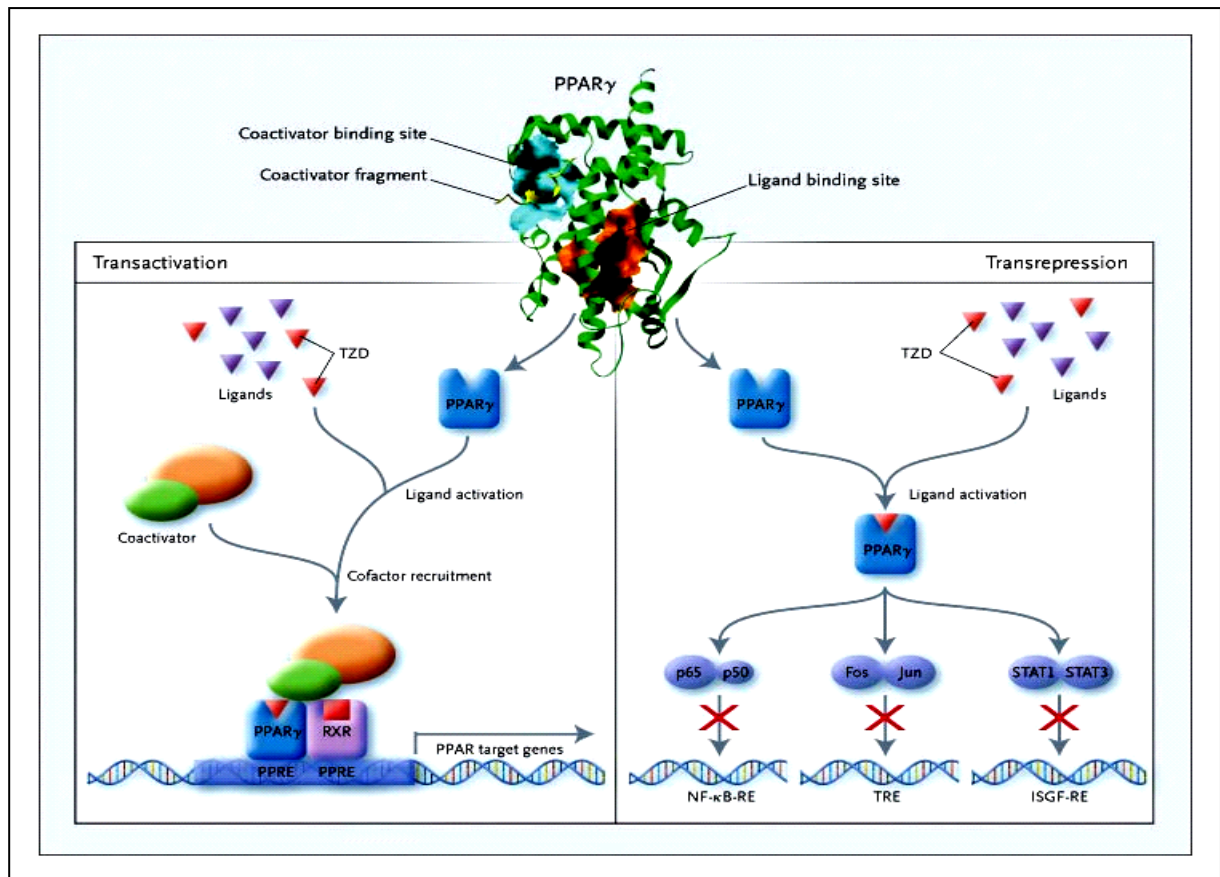


Figura 6: Estructura fina y mecanismo molecular de transactivación o transrepresión génica por activación de PPAR- γ mediante la unión un agonista a su sitio específico (Según Yki-Jarvinen, 2004, modificado).

Coactivator binding site: Sitio de unión del coactivador

Coactivator fragment: Fragmento coactivador

Ligand binding site: Sitio de unión del ligando

Transactivation: Transactivación

Ligands: Ligandos

TZD: Tiazolidinodionas

Ligand activation: Activación del ligando

Coactivator: Coactivador

Cofactor recruitment: Reclutamiento del cofactor

PPAR target genes: Genes diana de PPAR

4.2. Miembros del grupo de las de tiazolidinodionas

Los miembros de este grupo farmacológico utilizados en la terapéutica clínica son la rosiglitazona y la pioglitazona.

La troglitazona fue la primera en ser aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) en 1997 como hipoglucemiante en diabéticos tipo 2. Sin embargo, en marzo de 2000 fue retirada del mercado por su hepatotoxicidad.

Este efecto hizo pensar en el peligro de que la hepatotoxicidad se tratara de una reacción adversa que terminara invalidando cualquier potencial terapéutico de este grupo farmacológico. Sin embargo, una reciente revisión de 22 ensayos clínicos con más de 6000 pacientes en total no encontró una hepatotoxicidad aumentada en los que tomaban rosiglitazona o pioglitazona respecto a otras pautas terapéuticas (Lebovitz et al., 2002).

Existen además múltiples fundamentos teóricos para una especificidad en la hepatotoxicidad causada por la troglitazona. La troglitazona, al contrario que las otras dos tiazolidinodionas, se secreta predominantemente por el hígado y sufre circulación enterohepática (Bolton et al., 1996). También presenta una afinidad por el α -tocoferol, lo que puede dar lugar a metabolitos quinónicos (Saltiel et al., 1996). Y por último, como agonista PPAR- γ es 10 y 100 veces menos potente que la pioglitazona y la rosiglitazona, respectivamente, lo que obliga a usar en cada caso dosis 10 o 100 dosis mayores (Young et al., 1998).

La rosiglitazona es la molécula más potente de las tiazolidinodionas que existen actualmente en el mercado. Ha demostrado en varios ensayos clínicos su capacidad de disminuir la glucemia en diabéticos tipo 2 y mejorar la función

cardiovascular de los mismos, independientemente del control de la glucemia (Pistrosch et al., 2004). Sin embargo, la pioglitazona, a pesar de una menor potencia y de precisar una mayor dosificación, presenta ventajas específicas en el tratamiento de los pacientes diabéticos de tipo 2, debido a su favorable acción sobre el perfil lipídico. Diversos análisis retrospectivos de los datos de análisis aleatorizados han mostrado su mantenimiento de las concentraciones de colesterol LDL en pacientes diabéticos en seis series clínicas (Aronoff et al., 2000; Einhorn et al., 2000; Rosenblatt et al., 2001; Kipnes et al., 2001; Scherbaum et al., 2002; Rosenstock et al., 2002), mientras que la rosiglitazona aumentaba significativamente la concentración de colesterol LDL en otras cinco (Fonseca et al., 2000; Lebovitz et al., 2001; Raskin et al., 2001; Gómez-Pérez et al., 2002; Vongthavaravat et al., 2002;). Asimismo, la pioglitazona disminuyó las concentraciones de triglicéridos en cinco de las seis series analizadas, mientras que la rosiglitazona sólo lo consiguió en una de las cinco (Raskin et al., 2001).

Estos hallazgos fueron seguidos de un ensayo clínico aleatorizado diseñado específicamente para comparar el efecto de ambos fármacos sobre el perfil lipídico (Goldberg et al., 2005). La pioglitazona lo mejoró significativamente, en comparación con la rosiglitazona, disminuyendo las concentraciones de triglicéridos y aumentando el colesterol HDL. Se produjo un ligero incremento de colesterol LDL, aunque fue significativamente menor que en el grupo de la rosiglitazona. Además, cualitativamente disminuyó la concentración de LDL pequeñas y densas, que son las más oxidables y aterogénicas (Eckel et al., 2005).

Este efecto beneficioso sobre el perfil lipídico parece ser debido a la capacidad de la pioglitazona de comportarse como un agonista de PPAR- α , además de su agonismo hacia PPAR- γ (Bogacka et al., 2005). La implicación de este

mecanismo molecular en ese efecto terapéutico parece muy plausible, dado el importante papel, ya comentado, del PPAR- α en el metabolismo lipídico (Grau et al., 2005).

4.3. Generalidades sobre la pioglitazona

4.3.1. Estructura fina y mecanismo de acción

La pioglitazona es un fármaco tiazolidinodiónico que se une al sitio de unión del ligando del receptor intranuclear PPAR- γ . Esta unión genera un cambio conformacional de la proteína que posibilita su unión a otras proteínas cofactores y coactivadoras. El PPAR- γ activado forma entonces un heterodímero con el receptor X retinoide, y ambos promueven la expresión génica de una región del DNA conocida como elemento de respuesta a PPAR (PPRE). Además de este mecanismo de transactivación génica, la unión al ligando imposibilita la participación de PPAR- γ con otras proteínas (como NF- κ B, c-fos/c-jun, STAT1/STAT3), en la transcripción de otras regiones del DNA relacionadas con la inflamación celular. Este mecanismo se conoce como transrepresión (Yki-Jarvinen, 2004). La molécula de la pioglitazona se caracteriza por su estructura enantiómera. Su masa molecular es de 392.91 Da.

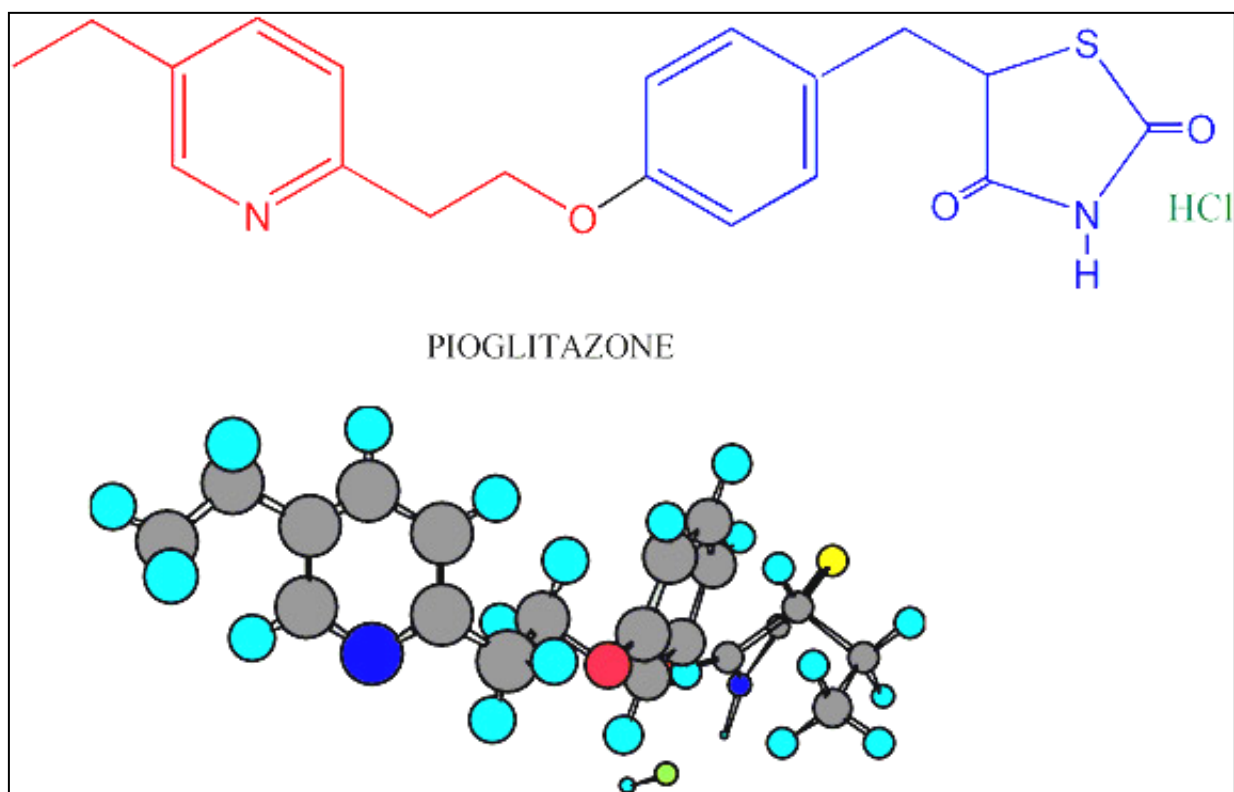


Figura 7: Fórmula química de la pioglitazona (Takeda Chemical Industries, Osaka, Japón). Los átomos de carbono se han coloreado de negro, los de hidrógeno de color turquesa, los de oxígeno en rojo, el de azufre en amarillo, el de cloro en verde y los de nitrógeno en azul.

4.3.2. Farmacología clínica de la pioglitazona

La pioglitazona es una molécula enantiómera que se administra como racémico. Tanto *in vitro* como *in vivo* existe conversión quiral. En plasma humano, la relación quiral +/- suele ser 2:3. La mayoría de los ensayos para el análisis de las concentraciones plasmáticas de pioglitazona no distinguen entre ambos enantiómeros. Se basan en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y su umbral mínimo de detección oscila entre 25 y 50 ng/ml (Eckland y Danhof, 2000).

La pioglitazona presenta una biodisponibilidad oral del 83%. La absorción es rápida, con una constante de absorción entre 0.40-1.17 h⁻¹. Presenta un modelo farmacocinético monocompartimental con absorción de primer orden (Eckland y Danhof, 2000).

Administrada una vez al día, sin especial cuidado con su simultaneidad con la comida, la pioglitazona se absorbe fácilmente y es metabolizada por el sistema del citocromo P-450 hepático. Los isoenzimas más importantes para esta función son CYP2C8/9 (que metaboliza el 40%), y CYP3A4 (que metaboliza algo menos del 20%). La pioglitazona no inhibe ni induce los citocromos del sistema P-450 relacionados con el metabolismo de otros fármacos (Yamazaki et al., 2000) y no se le han descrito interacciones destacadas.

La semivida plasmática de la pioglitazona es corta (9 horas), si bien sus efectos se mantienen debido a que genera metabolitos activos (M-II, M-III y M-V). Los metabolitos M-III y M-IV tienen una potencia hipoglucemiante de 40% y 60%, respectivamente, comparados con la pioglitazona. El M-II no es hipoglucemiante, pero reduce los triglicéridos con una potencia dos veces

mayor que la pioglitazona. En este parámetro, M-III y M-IV tienen una potencia parecida, aunque algo menor, que su fármaco de origen (Zhong y Williams, 1996).

El volumen de distribución de la pioglitazona es pequeño, de una media de 0.253 l/kg. Su unión a proteínas plasmáticas es alta, con una fracción libre menor del 3%. Su aclaramiento plasmático es lento (2.4 l/h), y no existe por ello saturación de los enzimas hepáticos implicados en su metabolismo dentro de la dosis terapéutica (15-60 mg). No se observan cambios importantes en su farmacocinética tras 9 días de dosis repetidas. La farmacocinética de la pioglitazona no sufre, en comparación con los voluntarios sanos, grandes cambios en ciertas poblaciones especiales como los diabéticos tipo 2 (la población a donde está dirigida), mayores de 65 años ni pacientes con insuficiencia renal o hemodiálisis. En pacientes con hepatopatía severa, sin embargo, existe un menor metabolismo y un aumento de la fracción libre, que puede acumularse. En diabéticos tipo 2, una dosis de 60 mg origina una C_{max} de 972 ± 266 ng/ml, con una t_{max} de 2.6 ± 0.9666 h y un área bajo la curva 10000 ± 3484 (Eckland y Danhof, 2000).

A fecha de hoy, y en las búsquedas realizadas, no existen datos farmacocinéticos de la pioglitazona en niños. Tampoco se han realizado ni diseñado estudios para evaluar el efecto de la etnicidad en la farmacocinética de este medicamento.

4.3.3. Valor terapéutico de la pioglitazona

La pioglitazona está aprobada por las agencias europea y estadounidense del medicamento como fármaco hipoglucemiante para el tratamiento de la diabetes tipo 2. No está, al menos por el momento, aprobada para el tratamiento del síndrome metabólico que tenga lugar sin diabetes tipo 2, aunque diversos ensayos clínicos, sin embargo, han demostrado su eficacia en este parámetro (Chiquette et al., 2004).

Sin embargo, su eficacia en el control de la dislipidemia en pacientes diabéticos ha sido asimismo probada y comentada (Khan et al., 2002; Goldberg et al., 2005). Del mismo modo, diversos ensayos clínicos han demostrado que sus beneficios en este tipo de pacientes son independientes en el control de la glucemia. Esto se ha observado cuando se ha considerado su efecto terapéutico sobre la función endotelial a un tiempo tan corto como 4 semanas (Martens et al., 2005). También reduce los marcadores séricos de inflamación y aterosclerosis (MCP-1, CRP, ratio íntima-media, LDL), aumentando los antiaterogénicos (HDL, adiponectina) en diabéticos tipo 2 independientemente del control de la glucemia (Pfutzner et al., 2005). La reducción del ratio íntima-media, no dependiente del control de la glucemia, se ha corroborado en otro estudio aleatorizado (Langenfeld et al., 2005).

Dado que las células vasculares y los macrófagos presentan receptores de PPAR- γ , puede ser plausible la idea de que algunos efectos beneficiosos de la pioglitazona sobre la función cardiovascular, independientes de su acción hipoglucemiante, se deban a efectos vasculares directos. Estudios de laboratorio parecen sostener esa idea.

La pioglitazona puede inhibir el índice proliferación/apoptosis de VSMC en cultivo (Pasceri et al., 2000). Las VSMC neointimales parecen además expresar el PPAR- γ en mayor medida, lo que las podría hacerlas más sensible, *in vivo*, a la acción del fármaco (Bishop-Bailey et al., 2002). También se ha descrito que, en macrófagos, el agonismo de PPAR- γ puede disminuir su capacidad inflamatoria, su migración y su secreción de citoquinas, estimulando el transporte reverso de colesterol (Hsueh y Law, 2001).

La pioglitazona también mejora la función endotelial, actuando directamente, *in vitro*, como inhibidor de la inflamación y apoptosis de células endoteliales (Artwohl et al., 2005), disminuyendo su expresión de moléculas de adhesión (Imamoto et al., 2004). Incluso se ha observado, en un pequeño estudio exploratorio, que la pioglitazona mejora la función endotelial en hipertensos no diabéticos (Horio et al., 2005).

Es por lo tanto emergente la idea de considerar la pioglitazona, además de cómo un fármaco hipoglucemiante para una enfermedad metabólica, como un fármaco cardiovascular para una enfermedad cardiovascular. La comprensión profunda de sus mecanismos de acción vasculares, y su relación con los mecanismos fisiológicos de control de la aterosclerosis, podría proporcionar valiosos conocimientos para el manejo futuro de la epidemia diabetes tipo 2-enfermedad cardiovascular.

OBJETIVOS

1. Determinar, en células de músculo liso vascular de aorta de rata, si la apoptosis inducida por pioglitazona es concentración-dependiente.
2. Determinar la implicación de la vía del TGF- β 1 en este efecto farmacológico.
3. Comprobar los resultados en células de músculo liso vascular humanas, obtenidas de arterias mamarias internas obtenidas tras la cirugía de revascularización coronaria.
4. Determinar las diferencias, en el efecto apoptótico y en la modulación de la vía del TGF- β 1, de la pioglitazona sobre células de músculo liso vascular de pacientes diabéticos y no diabéticos, así como su relación con la glucemia del medio de cultivo.
5. Determinar el posible efecto concentración-dependiente de la pioglitazona sobre la diferenciación y adhesión de células progenitoras endoteliales cultivadas, obtenidas de sangre periférica de sujetos sanos.
6. Estudiar, en este efecto farmacológico, la implicación e importancia de la vía del TGF- β 1.

OBJECTIVES

1. To determine whether the apoptotic effect of pioglitazone in rat vascular smooth muscle cells follows a concentration-dependent trend.
2. To establish the role of the TGF- β 1 pathway on this pharmacologic effect.
3. To test whether described effects are similar to effects on vascular smooth muscle cells from internal mammary arteries, extracted from patients who underwent by-pass surgery (both non-diabetic and diabetic patients).
4. To determine the differences and similarities between human vascular smooth muscle cells from non-diabetic and diabetic patients after as far the effects of pioglitazone are concerned, as well as the role of the concentration of glucose in cell culture medium.
5. To establish the concentration-dependence of pioglitazone in the differentiation and adhesion of human endothelial progenitor cells obtained from peripheral blood of healthy donors.
6. To determine whether the TGF- β 1 is involved in the concentration-dependent response of endothelial progenitor cells to pioglitazone.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE DIVERSOS MODELOS CELULARES

1.1. Modelo de VSMC de aorta de rata

1.1.1. Manejo de los animales de laboratorio

Se utilizaron ratas provenientes de la Unidad de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales seleccionados fueron ratas, de sexo macho para evitar diferencias en el ciclo hormonal, de un peso aproximado de unos 250 gr y unas 8 semanas de edad. Cumplida esa edad, los animales fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono en campana. Durante su cría, los animales fueron mantenidos en las citadas instalaciones, y el agua y la comida se les administraron *ad libitum*. Se cumplieron en todo momento las directivas europeas y las leyes españolas de mantenimiento y sacrificio de animales de laboratorio.

1.1.2. Obtención de cultivo primario de VSMC de rata

En unas condiciones estériles (bajo campana de flujo laminar), se practicó una incisión vertical en el tórax de la rata previa limpieza del campo quirúrgico con povidona yodada, retirándose la parrilla costal y procediéndose a la disección y extracción de la aorta torácica, manteniendo en todo momento el uso de material quirúrgico autoclavado. La aorta extraída se colocó en un tubo estéril con 10 ml de medio de cultivo DMEM, con un 10% de suero fetal bovino (FCS)

y 1% de antibiótico (los tres, de Gibco, Madrid). La aorta, en el medio, se trasladó a la campana de flujo adyacente (Laboratorio de Cultivos Celulares).

En la campana de cultivos, la aorta se depositó en una placa de Petri estéril, con el mismo medio de cultivo, procediéndose a su limpieza con un nuevo juego de material quirúrgico estéril, eliminándose la capa adventicia.

Dado que la capa media de las arterias elásticas, sobre todo en animales jóvenes, presenta una elevada masa proporcional de sustancia intercelular en relación a la de las VSMC, realizamos una digestión enzimática con una solución de colagenasa (0.4%), y albúmina de suero bovino (BSA, 0.2%, ambas de Sigma, Madrid), en medio DMEM (Gibco, Madrid). La solución final fue esterilizada por filtración en filtro estéril de 0.2 μm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

La digestión por colagenasa se realizó en dos pasos:

- Un paso rápido para eliminar químicamente los restos de fibroblastos no extraídos a mano. Incubación de 7 min a 37° C. Posteriormente, la aorta fue centrifugada con objeto de eliminar los restos de fibroblastos (2 ó 3 min a 500-600 rpm). La aorta fue después trasladada a otra placa de Petri con solución estéril, en campana, cortada longitudinalmente y abierta, tomando la forma de un rectángulo alargado. El endotelio fue eliminado mediante un suave raspado con objeto de denudar las células endoteliales y aumentar la pureza de VSMC en nuestro modelo.

-

- Incubación prolongada de 4 h. Para ello, se cortó la aorta en pequeños fragmentos y se introdujo, junto con la solución de colagenasa, en un tubo estéril que fue incubado, durante el tiempo convenido, a 37° C.

Durante ese tiempo, se colocó medio de cultivo normal para VSMC de rata (DMEM+10% FCS+1% antibiótico-antimicótico), en dos botellas estériles de cultivo F25 (Nunc, Roskilde, Dinamarca), con 5 ml por botella, manteniéndolas en el incubador durante 4 h, con objeto de estabilizar las concentraciones de gases y el pH del medio de cultivo.

A las 4 h, los fragmentos de aorta se centrifugaron 7 min a 1000 rpm y se lavaron 2 veces con medio normal de cultivo, con objeto de eliminar los restos de colagenasa. Posteriormente se resuspendieron en 3 ml de medio y se depositaron en una botella. A los 20 min, tiempo estimado de adhesión para posibles fibroblastos que pudieran contaminar nuestra población de VSMC, se llevó el contenido de una placa a la otra, que se mantuvo cambiando el medio cada 3 días. Las células se mantuvieron en un incubador de cultivo celular (Mettler, Schwabach, Alemania), en condiciones estériles, a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Los experimentos se realizaron en células entre los pases 3 y 5.

El fenotipo de VSMC en este cultivo celular se comprobó por visualización morfológica en microscopio invertido (Leica, Madrid). Las VSMC presentaban su característica apariencia fusiforme, duplicando su extensión cada 24 h hasta adquirir una típica apariencia de cultivo en valles y colinas. El fenotipo fue también corroborado por expresión constitutiva de α -actina específica de

músculo liso, tanto por inmunofluorescencia confocal como por Western Blot (ambos abordajes técnicos se describen en el apartado correspondiente).

1.2. Obtención de VSMC humanas

1.2.1. Extracción de las arterias en quirófano

Las arterias más frecuentemente utilizadas en Cirugía cardíaca de revascularización coronaria son las arterias mamarias internas. Se utilizaron restos sobrantes de estas arterias, obtenidas en los quirófanos de Cirugía cardíaca del Hospital Clínico Universitario San Carlos (Madrid). Estos restos sobrantes son normalmente desechados tras la toma del segmento usado para la técnica quirúrgica, por lo que no se interfirió en el proceso clínico.

1.2.2. Aislamiento de VSMC humanas de la arteria mamaria

Las células de músculo liso arterial humanas se aislaron mediante técnica de explantes. Para ello, se separó la adventicia y se cortó el vaso longitudinalmente, procediéndose a la denudación de la capa endotelial. Posteriormente, el vaso se cortó en pequeños fragmentos, que se adhirieron a la pared de una botella de cultivo F25 (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con una punta fina de pipeta Pasteur estéril. A las 2 h de incubación en la estufa de cultivos, las botellas se colocaron en la posición normal, quedando los

fragmentos de tejido bañados por el líquido nutritivo. A las dos semanas, las VSMC surgieron de los explantes.

Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con antibiótico-antimicótico (penicilina G, anfotericina B y estreptomicina) al 1% y 20% de suero fetal bovino (Gibco, Madrid) con recambio del medio dos veces por semana. Los experimentos se realizaron en células entre los pases 3 y 5.

Las células se mantuvieron en un incubador de cultivo celular (Mettler, Schwabach, Alemania), en condiciones estériles, a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

El fenotipo de VSMC en este cultivo celular se comprobó por visualización morfológica en microscopio invertido (Leica, Madrid). Las VSMC presentaban su característica apariencia fusiforme, duplicando su extensión cada 72 h hasta adquirir una típica apariencia de cultivo en valles y colinas. El fenotipo fue también corroborado por expresión constitutiva de α -actina específica de músculo liso, tanto por inmunofluorescencia confocal como por Western Blot (ambos abordajes técnicos se describen en el apartado correspondiente).

1.3. Obtención de células progenitoras endoteliales (EPCs) desde sangre humana

1.3.1. Obtención y manejo de la sangre

Se utilizó sangre sobrante de donantes procedente de bolsas de donación, tras la separación de los hemoderivados. Este material se obtuvo del Servicio de Medicina Transfusional de la Clínica Universitaria de Aquisgrán, Escuela Tecnológica de Renania-Westfalia, Aquisgrán, Alemania.

La sangre se extrajo en condiciones de esterilidad utilizando una jeringa de 50 ml, estéril (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), con 5 ml de citrato sódico dextrano en proporción de 1:1 (Ambos de Sigma, Aquisgrán, Alemania). Tras esperar 20 minutos en posición vertical, en la campana de flujo, la fase superior (30 ml) se trasladó a dos tubos estériles, cada uno con 15 ml de Ficoll (Sigma, Alemania), utilizando para ello una mariposa y tubo de goma, estériles, y manteniendo constante el flujo de vertido. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 20 min a 2400 rpm, con frenada paulatina.

1.3.2. Separación de sangre en gradiente de densidad

De cada tubo, en campana, se aspiró el suero y se extrajo, con una pipeta serológica, la fase blanquecina de células mononucleares. Se lavaron dos veces en PBS estéril, y se resuspendieron en medio de cultivo Medio MV-II para microvasculatura (Promo-Cell, Aquisgrán, Alemania). Posteriormente, las

células mononucleares obtenidas se sembraron en placas estériles de 6 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), previamente mantenidas en la campana de flujo con 1 ml/pocillo de fibronectina a 10 µg/ml en PBS (Tebu-Bio, Offenbach, Alemania), a 10 millones de células por pocillo.

Las células se mantuvieron en las condiciones generales de cultivo ya descritas en apartado 1.1.2., cambiándose el medio el día 4 y realizándose el experimento en cuestión el día 7. Las células desarrollaron una morfología típica de las células progenitoras endoteliales (EPCs) en cultivo, con una apariencia adoquinada y epiteliode, formando colonias redondeadas rodeadas por células de apariencia más fusiforme.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

2.1. Contaje celular

Las células de músculo liso vascular fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), a una densidad de 4000 células/pocillo, y se esperó 24 h a que se adhirieran. Tras el tratamiento (4 pocillos en cada grupo), se tripsizaron con 100 µl de tripsina, antagonizándose después con 500 µl de medio con 10% de FCS y depositándose la suspensión resultante en un tubo Eppendorf. Las células se contaron por duplicado en una cámara de Neubauer.

2.2. Metabolismo celular (kit de XTT)

Este ensayo se basa en la capacidad de las células activas para la transformación de la sal de tetrazolio XTT (Sodio 3,3,-[(Phenylamino)carbonil]-3,4-Tetrazolio-Bis(4-metoxi-6-nitro) ácido bencenosulfónico hidratado), de color amarillo, a una tinción de formazán, de color naranja. Por lo tanto, esta conversión sólo tiene lugar en las células viables. Las células se despegaron con tripsina y sembraron en una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), en una proporción de 1000 células/100 µl de medio, por cada pocillo. Al día siguiente se añadió el fármaco y el control, por cuadruplicado. Transcurridos 1, 3 y 6 días se procedió a la cuantificación de la viabilidad. Para

ello, tras añadir el reactivo XTT, 50 μ l/pocillo (kit de XTT®, Roche Diagnostics, Madrid), se incubó 4 h a 37° C, y transcurrido ese tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia, en un lector de placas, a una longitud de onda de 450 nm.

2.3. Citotoxicidad celular (actividad de LDH)

Esta técnica mide la citotoxicidad de nuestro fármaco mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Esta enzima reduce el ácido pirúvico a ácido láctico, mostrando un fracaso en la normal nutrición aerobia de la célula. Además, se mide en el medio, y siendo una enzima citoplasmática, su salida denota una discontinuidad de la membrana, indicativa de sufrimiento celular.

Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), poniendo en cada pocillo 1 ml de volumen y 10000 células. Al día siguiente, se cambió el medio por los grupos tratados, o control, por triplicado, en un medio de cultivo de DMEM con 2% de suero fetal de caballo.

A las 24 h, se tomaron los sobrenadantes (cada pocillo a un tubo por separado, tomando sólo 700 μ l del mililitro que había), y se colocaron en tubos Eppendorf convenientemente rotulados. Después, se centrifugó a 500 rpm durante 1 min, para no tomar las posibles células muertas flotantes. Una vez centrifugado, se tomaron 500 μ l de la porción superior del tubo, poniendo 100 μ l en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

Justo en ese momento se disolvieron 0.5 mg de NADH recién pesada, por ml de ácido pirúvico 0.2 mg/ml en buffer fosfato 0.1 mol/l (en stock en la nevera). La solución resultante se añadió encima de cada pocillo (100 µl/pocillo, obteniéndose por lo tanto 200 µl en total.). Inmediatamente después, la placa se leyó en un lector de ELISA, a 340 nm, en 2.5 min, la pendiente de degradación en la fluorescencia de NADH.

2.4. Medida del ciclo celular por citometría de flujo

Las células se hicieron crecer en botellas de cultivo pequeñas, modelo F25 (Nunc, Roskilde, Dinamarca), y se trataron con los fármacos. A las 24 h, se recogieron los núcleos utilizando una solución de Vindelov, 3 ml/botella (Trizma base TRIS 1 mol/l, Cloruro sódico a 0.5 mol/l, Tween 20® al 10%, Ribonucleasa A (RNasa), a 10 mg/ml en PBS, todo ello disuelto en agua destilada, miliQ y autoclavada, con el pH final ajustado a 8).

Cada botella con solución de Vindelov se agitó durante 10 min, a temperatura ambiente, con suavidad para evitar la formación de excesiva espuma. Después, el contenido de cada botella se trasladó a un tubo convenientemente etiquetado, centrifugando después a 3000 rpm durante 8 min. Se retiró el sobrenadante con una pipeta, y el sedimento se resuspendió en 100 µl de PBS. A esa solución se añadieron 30 µl de yoduro de propidio (PI) al 0.05% en agua. Los tubos se guardaron a 4° C protegidos de la luz hasta su análisis en un citómetro de flujo modelo FACScan (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ,

USA), equipado con un láser de argón de 15 mW, con una longitud de onda de emisión de 488 nm. La fluorescencia del yoduro de propidio se determinó con un filtro 575/24-BP, y se analizaron 10000 núcleos en cada tubo.

2.5. Captación de BrdU (síntesis de DNA)

La síntesis de DNA se midió como captación de la falsa base bromo-deuxiridina (BrdU), mediante un ensayo colorimétrico basado en un anticuerpo frente a ella, ligado a una enzima que produce un cambio de color (kit de BrdU, Amersham, Barcelona).

En primer lugar, se sembraron 5000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), con un volumen de 100 μ l/pocillo. Posteriormente, se procedió al ayuno mediante incubación en medio de cultivo con 0.4% de FCS, durante 32 h, con objeto de sincronizar el ciclo celular. Después, el medio en presencia o ausencia de los fármacos se añadió al cultivo y se incubó durante 21 h (en células de rata), o 16 h (en células humanas). En ese momento, se añadió al medio de cultivo BrdU a una concentración de 10 μ l/pocillo, mezclando con el medio de cultivo y volviendo a incubar durante 3h a 37° C, con objeto de permitir que la BrdU se incorporara a las células que estuvieran llevando a cabo la síntesis de DNA.

Posteriormente, las células se fijaron, añadiendo la solución fijadora presente en el kit (200 μ l/pocillo), y dejando actuar durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez retirado el fijador, se añadieron 200 μ l/pocillo de solución de

bloqueo y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró esa solución, y fueron añadidos 100 µl/pocillo de anticuerpo del kit anti-BrdU-HRP (peroxidasa de rábano). La placa se incubó con el anticuerpo durante 90 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la placa se lavó 3 veces con 250 µl/pocillo de PBS, y se incubó con 100 µl/pocillo de la solución de sustrato del kit, durante 20 min, protegida de la luz. Entonces, la reacción fue detenida mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 mol/l. La placa se leyó inmediatamente después, a una longitud de onda de 450 nm.

2.6. Fragmentación de DNA: medición por ELISA

Con esta técnica, se observa y cuantifica si el DNA de nuestras células está siendo fragmentado en trozos pequeños, lo que es un paso final en el proceso de apoptosis. Es por ello una técnica muy específica para medir este parámetro (la LDH mide sufrimiento celular, de una forma poco específica). Se utilizó un kit comercial de ELISA de fragmentación de DNA (Roche Diagnostics, Madrid).

En primer lugar, se sembraron las células en una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Al día siguiente, una vez pegadas las células, se añadió la falsa base BrdU (1:1000), para que las células la incorporaran a su DNA. Después, se lavaron las células con PBS y se añadió el medio de cultivo en presencia o ausencia de los fármacos. El día anterior a la realización del experimento, se recubrió una placa MTP de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de solución anti-DNA de 96 pocillos, dejándolo toda la

noche a 4° C. El día del experimento, se añadieron 200 µl/pocillo de la solución de lisis a la placa de las células, incubando 30 min a temperatura ambiente. Después, se tomaron 100 µl/pocillo de esa placa a la placa MTP recubierta con anti-DNA. Se esperó 90 min a temperatura ambiente. Después se lavó la placa y se introdujo 5 min en un microondas a 500 W, y se enfrió posteriormente durante 10 min a -20° C. Tras ese paso, se añadieron 100 µl/pocillo de solución anti-BrdU-POD conjugado (90 min a temperatura ambiente). Más tarde, tras lavar la placa, se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo coloreado. La reacción se detuvo tras 20 min de incubación a temperatura ambiente, por adición de 25 µl/pocillo de ácido sulfúrico a 1 mol/l. La placa, finalmente, se midió en un lector de absorbancias a una longitud de onda de 450 nm (corrección de 600-690 nm).

2.7. Medición de apoptosis por actividad de caspasa-3

La apoptosis se midió, de forma adicional, como actividad enzimática de la enzima proapoptótica caspasa-3, vía final de diversos mecanismos de muerte celular programada. Se utilizó un kit comercial para este cometido (Calbiochem, Schwabach, Alemania). Brevemente, las células se sembraron y trataron durante 24 h con el fármaco o control en placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Tras ello, se les añadió el reactivo del kit que convierte el producto de esta enzima en una sustancia coloreada. Se midió la fluorescencia (405 nm de longitud de onda) a diversos tiempos (5, 15, 30, 60, 120 min). La pendiente de la recta fue tomada como medida de actividad de la caspasa-3.

2.8. Adhesión en flujo

Con objeto de medir la adhesión celular en condiciones de flujo, se realizaron los ensayos de flujo, como está descrito (Weber et al., 1999). Brevemente, las placas de cultivo se recubrieron con fibronectina (10 µg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Dichas placas se colocaron posteriormente en la parte inferior de una cámara de flujo con un microscopio Olympus IX50 acoplado (Olympus Optical Co.) con un objetivo UPlanFI ×10. Las EPCs (tratadas o no con pioglitazona) se resuspendieron en medio HHMC (medio HBSS tamponado con HEPES. El medio HBSS se realiza con 1 mmol/l de Mg^{2+} , 1 mmol/l de Ca^{2+} y 0.5 % de BSA). Las células, resuspendidas, se mantuvieron a 37° C y se prefundieron a una Dina/cm². Después de 4 min, se contó el número de células firmemente adheridas por interacción primaria con la matriz de fibronectina en múltiples campos, mediante análisis de imágenes grabadas con una videocámara JVC 3CCD.

2.9. Cuantificación de ácidos nucleicos

Con objeto de medir la proliferación del cultivo de EPCs, se sembraron estas células sobre placas de 48 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), recubiertas con fibronectina (10 µg/ml en PBS, Tebu-Bio, Offenbach, Alemania). Tras el tiempo de incubación con pioglitazona, a las células se les aspiró el medio, y las

placas fueron almacenadas a -70°C . El día del experimento, las placas se descongelaron manteniéndolas 20 min a temperatura ambiente. Se les añadió el reactivo CyQuant (Molecular Probes, Eugene, USA), y se incubaron de nuevo 20 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. La fluorescencia se midió a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Se cuantificaron los cambios en la expresión de proteínas en cultivos celulares, estudiándose la acción farmacológica de la pioglitazona sobre este efecto. En el momento de extracción de las proteínas, se procedió a lavar el pocillo de cultivo con PBS, se lisaron las células con una solución de lisis (Glicerol 50%, SDS 10%, 1 mol/l de Tris pH 6.8, 0.5 mol/l de EDTA y 5 mol/l de NaCl), y se recogieron las células lisadas con espátula y pipeta. Las muestras fueron almacenadas y etiquetadas a -20° C. La medición de la concentración de proteínas en cada lisado en cuestión se realizó por el método del ácido biciniquónico. Para ello, se depositaron, 5 µl de cada muestra, por duplicado, en diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Después, se añadieron, justo después de mezclarlos, una solución de sulfato de cobre al 2% en ácido biciniquónico (200 µl por pocillo). Tras incubar 30 min a 37° C, la concentración de proteínas se determinó en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 550 nm, mediante una curva de calibrado frente a concentraciones conocidas de BSA, disuelta en la misma solución de lisis.

3.2. Técnica de Western Blot para cuantificación de proteínas

Las muestras descongeladas se hirvieron durante 5 min a 95° C para desnaturalizar las proteínas. Las proteínas (30-50 µg) se separaron según su peso molecular mediante electroforesis en un gel de acrilamida-SDS al 10%. Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF) (Amersham, Barcelona) mediante aplicación de corriente eléctrica. El bloqueo para los sitios inespecíficos se realizó con 3% de BSA en TBS-Tween® (Tris 25 mmol/l, NaCl 75 mmol/l, Tween 20® 0.1%, pH 7.4). La incubación con anticuerpos primario y secundario fue similar a la utilizada en cortes histológicos. La inmunoreactividad se determinó por un sistema de detección de quimioluminiscencia para Western blot, en cámara oscura (ECL kit, Amersham, Barcelona). Se tomó la expresión de α -actina de músculo liso como proteína constitutiva de referencia, y al mismo tiempo para corroborar el linaje muscular liso en nuestro cultivo celular.

3.3. Localización intracelular de proteínas por microscopía confocal

El microscopio confocal realiza un barrido láser sobre la superficie a analizar (tejidos o células en cultivo), y puede resaltar fluoróforos a diferentes longitudes de onda. De esta manera, marcando una molécula determinada con un anticuerpo unido a un fluoróforo, podremos observar si se expresa o no,

cuantificarlo, y localizarlo, e incluso podemos cuantificar diferentes proporciones en diferentes lugares de la célula. Esto es muy útil para verificar la entrada al núcleo de una proteína cuando se activa, un fenómeno conocido como reclutamiento o internalización nuclear.

Las células se levantaron con tripsina (Gibco Life Technologies, Madrid) y se sembraron en cubreobjetos previamente esterilizados por inmersión de 48 h en una placa de Petri, en etanol de 70°. Antes de la siembra, los cubreobjetos fueron secados, para lo cual se extrajeron de la placa de Petri con pinzas, en campana, y se apoyaron contra una placa vacía de 6 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), dejándolos secar durante 20 min, en campana y con la luz ultravioleta conectada.

Al día siguiente, una vez pegadas las células, se añadieron los fármacos correspondientes. Tras su incubación durante 0.5, 1, 3, 6, 18 o 24 h. las células fueron sometidas a un proceso de fijación. Para ello, se aspiró el medio, lavando con PBS (3 veces), tras lo cual se añadieron a cada pocillo 2 ml de formaldehído al 4% en PBS, dejándolo actuar 20 min a temperatura ambiente.

Terminado el proceso de fijación, se lavó 2 veces con PBS y las muestras fueron guardadas a 4° C, forradas en plástico para evitar la evaporación, hasta la adición de los anticuerpos. En el día de adición de los mismos, se procedió previamente a un bloqueo de uniones inespecíficas, mediante la adición, en cada pocillo, de 2 ml de BSA al 3% en PBS. Tras lavar una vez con el líquido de bloqueo, se añadió de nuevo una solución de Tritón al 0.4% en el mismo, con objeto de permeabilizar las células. Se dejó actuar 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se procedió al lavado con el líquido de bloqueo (3 lavados, a intervalos de 5 min), y se añadió el anticuerpo primario, diluido 1:100

en el líquido de bloqueo. Tras dejarlo actuar 1 h a temperatura ambiente, se lavó 3 veces de la misma manera, y se añadió, también durante 1 h y diluido en el líquido de bloqueo, el anticuerpo secundario a Alexa-568® (espectro rojo). Tras esperar 1 h protegido de la luz, las muestras se lavaron 5 veces en el líquido de bloqueo. El montaje se realizó tras añadir una gota de medio de estabilización (Slowfade Antifade kit®, Molecular Probes, Barcelona), 10 min a temperatura ambiente, protegido de la luz. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos, convenientemente rotulados, utilizando el medio de montaje Mowiol® (Calbiochem, Schwabach, Alemania).

La visualización de las proteínas se realizó por microscopía de inmunofluorescencia confocal (microscopio LEICA TSC, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

3.4. Secreción de proteínas por ELISA de medio condicionado

La palabra ELISA significa ensayo por absorbancia mediante anticuerpos ligados a enzimas. Esta técnica permite conocer la concentración de una sustancia determinada en un medio líquido. El ELISA de medio de cultivo condicionado permite comprobar y cuantificar si las células secretan una sustancia en respuesta a un estímulo, en un tiempo determinado. La manera más objetiva y reproducible de expresar esto es con la concentración de la sustancia en el medio dividida entre la concentración de proteínas en el mismo pocillo.

Las células se sembraron a una cantidad de 6000 células y 300 μ l por cada pocillo de una placa de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Tras 24 h, se procedió a cambiar el medio por los controles y fármacos (400 μ l/pocillo, haciendo triplicado de cada condición). En el tiempo indicado, los sobrenadantes se recogieron y etiquetaron en tubos Eppendorf, y fueron congelados a -70° C. Las proteínas fueron recogidas usando la misma solución de lisis que la utilizada para los ensayos de Western Blot. Se recogieron del fondo del pocillo tras la extracción de los sobrenadantes, y se guardaron a -20° C, convenientemente etiquetadas.

Las concentraciones de proteínas totales se calcularon siguiendo el método del ácido bicinquinónico, comentado con anterioridad.

Los sobrenadantes se descongelaron y analizaron, por duplicado, en un kit comercial de ELISA para TGF- β 1, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

3.5. Citometría de flujo para expresión proteica.

Además de la cuantificación del ciclo celular por tamaño y complejidad nuclear, el citómetro de flujo se usó para validar el porcentaje de EPCs positivas o negativas para diversos marcadores de su linaje, como Dil-Ac-LDL (Tebu-Bio, Offenbach, Alemania), Lectina (Sigma, Madrid, España), y anticuerpos anti-CD31, anti-CD14 y anti-KDR (los tres de Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Las sustancias añadidas estaban marcadas con ficoeritrina o isotiocianato de fluoresceína (FITC) para su selección por el citómetro. También

se analizó, por citometría de flujo, la positividad de nuestras células en cultivo celular para CD105 (endoglina), utilizando anticuerpos marcados con FITC, de Serotec (Oxford, Reino Unido).

4. PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

4.1. Selección de pacientes

Se reclutaron pacientes con enfermedad coronaria oclusiva del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico San Carlos de Madrid los cuales fueron sometidos a revascularización miocárdica y de los que se obtuvo un segmento de arteria mamaria interna. La cirugía se llevó a cabo siguiendo el método estándar de la práctica clínica regular. La revascularización miocárdica se realizó con la arteria mamaria interna bilateral. Las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio fueron revisadas para la obtención de los siguientes datos: edad, género, hábito tabáquico, diagnósticos de diabetes mellitus, hipertensión arterial, hiperlipidemia e índice de masa corporal (IMC), puntuación obtenida en la escala EuroSCORE, valores séricos preoperatorios de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y glucosa en mg/dl, historia de complicaciones postoperatorias cardiovasculares (infarto miocárdico perioperatorio, arritmia grave, insuficiencia cardíaca), renales (insuficiencia renal aguda), accidente cerebrovascular o muerte antes de su baja hospitalaria.

El diagnóstico de diabetes mellitus se definió como concentraciones de glucosa en sangre mayor de 126 mg/dl (≥ 7.8 mmol/l en UI) o el uso de fármacos antidiabéticos. La hipertensión arterial se definió como tensión sistólica superior a 140 mmHg y/o diastólica mayor de 90 mmHg o bien el uso de medicamentos antihipertensivos. La hipercolesterolemia se definió como niveles plasmáticos de colesterol mayores de 200 mg/dl (≥ 5.0 mmol/l en UI) o el uso de

hipolipemiantes. Los criterios de exclusión fueron: pacientes mayores de 75 años, presencia de patologías que afecten al estado inflamatorio general (fallo renal, enfermedades hepáticas, etc.) y pacientes con cáncer.

4.2. Aspectos éticos y legales

Los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado para la participación en el estudio, y se respetaron las directrices de la Declaración de Helsinki, así como la legislación española y europea sobre participación en protocolos de investigación clínica. La información clínica individualizada fue codificada con un código de encriptación de acuerdo a la legislación vigente.

Fue un estudio de bajo riesgo, ya que los datos se obtuvieron en forma retrospectiva de los expedientes. La técnica de utilizar el fragmento de arteria sobrante permitió no interferir en el acto quirúrgico, usándose un material que normalmente se desecha. Ni los tiempos ni la dificultad técnica del abordaje quirúrgico se vieron aumentados por nuestra intervención.

5. ESTADÍSTICA

Se realizó análisis descriptivo univariado y bivariado por diagnóstico de diabetes mellitus de los datos clínicos con pruebas de Chi-cuadrada, exacta de Fisher, t de Student o U de Wilcoxon-Mann-Whitney según correspondió. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) o su equivalente no paramétrico y con prueba post-hoc HSD de Tukey en el caso de que la ANOVA fuera significativa. El análisis exploratorio de asociación entre variables se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson si ambas variables tenían distribución normal y con la Rho de Spearman en caso contrario. La regresión simple se realizó de la forma paramétrica habitual. Los programas estadístico y gráfico utilizados fueron GraphPad Prism version 3.0 para Windows y R versión 2.0.1.

6 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Las VSMC de ratas y pacientes se mantuvieron en un medio compuesto por DMEM (rata) o RMPI (humano), con 20% de suero fetal de tenero o FCS (los tres productos de Gibco Life Technologies, Madrid). Los experimentos se hicieron sin embargo en un medio libre de suero, compuesto por DMEM o RPMI en cada caso, con 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA), para mantener la presión osmótica, y suplementado con 10 ng/ml de PDGF-BB (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, isoforma BB). Tanto la BSA como el PDGF se compraron a Sigma (Madrid).

Para las EPCs, se usó en todo momento un medio comercial MV-II para microvasculatura (PromoCell, Madrid), que tiene una proporción de 5% de FCS. La pioglitazona utilizada en todos estos estudios se obtuvo por una generosa donación de Industrias Químicas Takeda (Osaka, Japón), y se disolvió directamente en los medios de cultivo.

El GW9662 se compró a Tocris (Bristol, Reino Unido), y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Madrid). La solución de DMSO en el cultivo celular nunca superó la dilución 1:1000.

RESULTADOS

1. EFECTOS SOBRE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATA

1.1. Viabilidad celular

1.1.1. Actividad metabólica mitocondrial por ensayo XTT

Como puede apreciarse en la Figura 8, las concentraciones de pioglitazona (PIO) de 10, 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$ son capaces de inhibir la actividad metabólica de las VSMC de rata, de una forma estadísticamente significativa a los 6 días.

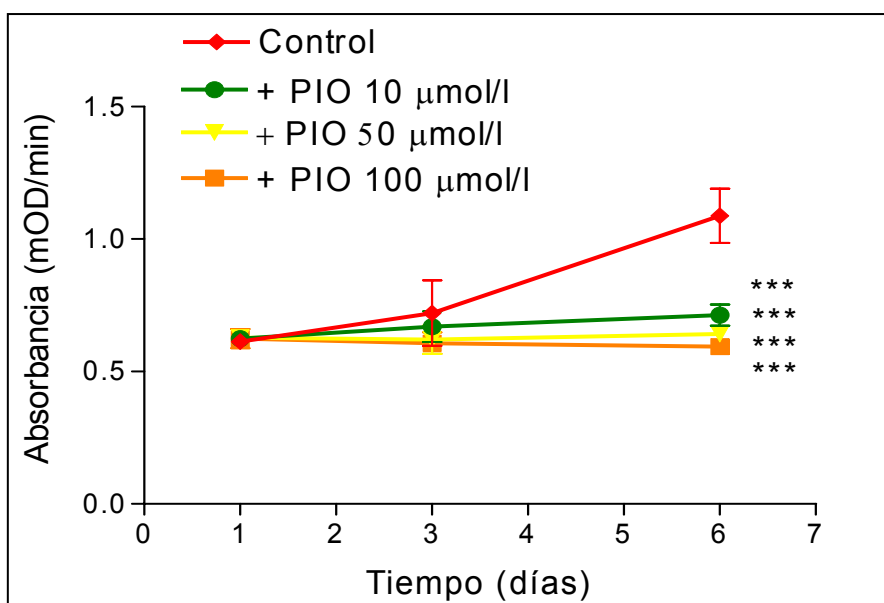


Figura 8: Actividad metabólica en respuesta a concentraciones crecientes (10, 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$) de la pioglitazona.

*** $p < 0.001$

1.1.2. Citotoxicidad

Con el objetivo de averiguar si el descenso descrito de la actividad metabólica pudiera deberse a un efecto citotóxico del fármaco, se realizó un ensayo enzimático de actividad de LDH, como medida de citotoxicidad celular. Como se aprecia en la Figura 9, la concentración más alta utilizada en este trabajo no produce una elevación significativa en la actividad del susodicho enzima (24 h).

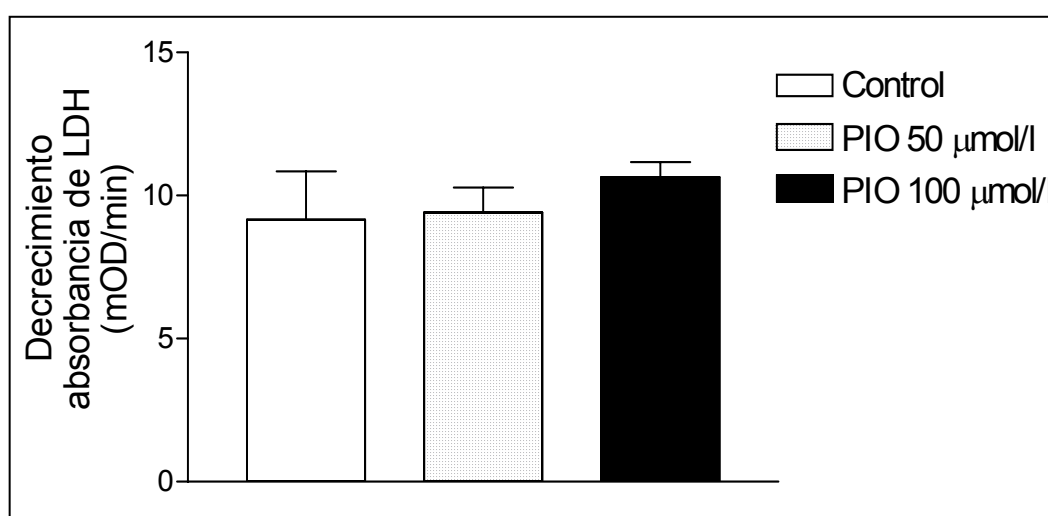


Figura 9: Efecto de la pioglitazona en la citotoxicidad, medida como actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

1.1.3. Contaje celular

El contaje celular se realizó para comprobar si el descenso detectado en la actividad metabólica del cultivo celular al ser incubado con PIO pudiera deberse a un efecto del fármaco en el número de células (proliferación). A las 24 y 72 h, observamos que la PIO provoca un descenso en el número de células, de forma estadísticamente significativa tanto para la concentración de 50 como la de 100 $\mu\text{mol/l}$. Sin embargo, sólo la mayor concentración utilizada presenta un efecto significativo en el descenso del número de células cuando estas se cuentan a las 24 h (Figura 10).

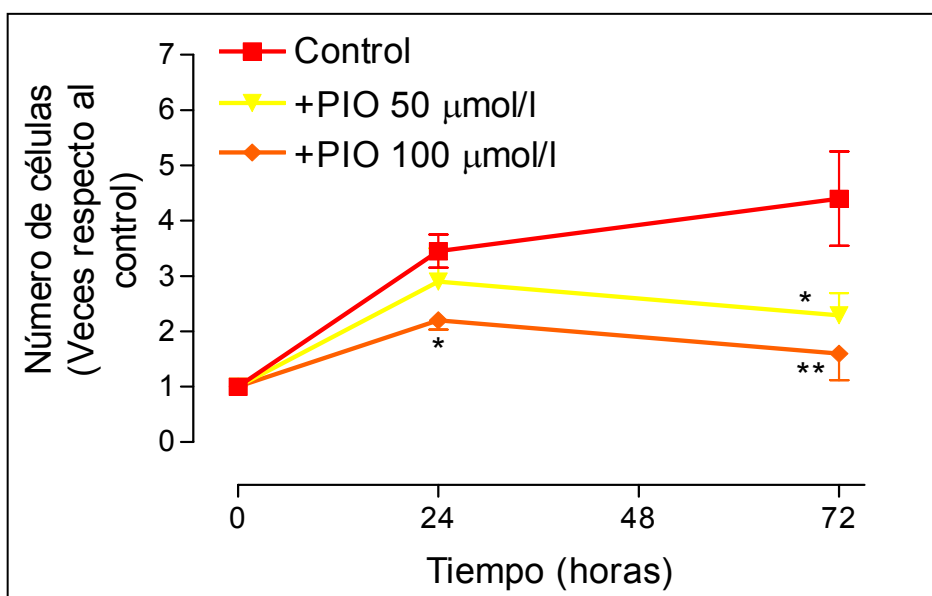


Figura 10: Efecto de la pioglitazona (50 y 100 $\mu\text{mol/l}$) en el número de células, medido como contaje mediante cámara de Neubauer, a las 24 y 48 h.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

1.1.4. Síntesis de DNA

La Figura 11 muestra el efecto de pioglitazona (50 y 100 $\mu\text{mol/l}$) respecto a la captación de la falsa base BrdU frente al estímulo apoptótico del factor de crecimiento PDGF, isoforma BB (10 ng/ml), como indicativa de síntesis de DNA. Como se aprecia en la gráfica, ninguna de las dos concentraciones del fármaco que nos ocupa realiza un efecto estadísticamente significativo en lo que a este parámetro se refiere.

Del mismo modo, con objeto de comprobar la influencia de la vía del TGF- β 1 en este parámetro, los experimentos, en las tres condiciones, se realizaron en ausencia (no anti-TGF- β 1) o presencia (anti-TGF- β 1) de anticuerpo neutralizante, a 50 $\mu\text{g/ml}$.

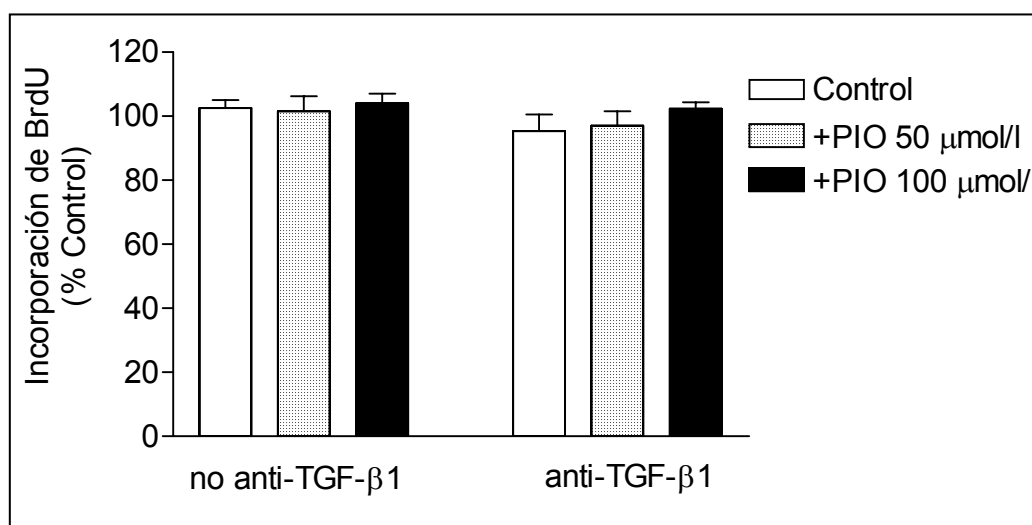


Figura 11: Efectos de la pioglitazona (50 y 100 $\mu\text{mol/l}$) en la síntesis de DNA, medida como incorporación de la falsa base BrdU.

1.2. Apoptosis

1.2.1. Fragmentación de DNA: curva de tiempos y concentraciones

Como puede apreciarse en la Figura 12, la concentración más elevada de PIO (100 $\mu\text{mol/l}$) aumenta de forma significativa la fragmentación de DNA, indicativa de muerte celular por apoptosis, a los tiempos de 24, 48 y 72 h. Debido a ello, se escogió esta concentración para estudiar los mecanismos moleculares de acción que regulasen el efecto farmacológico de la pioglitazona.

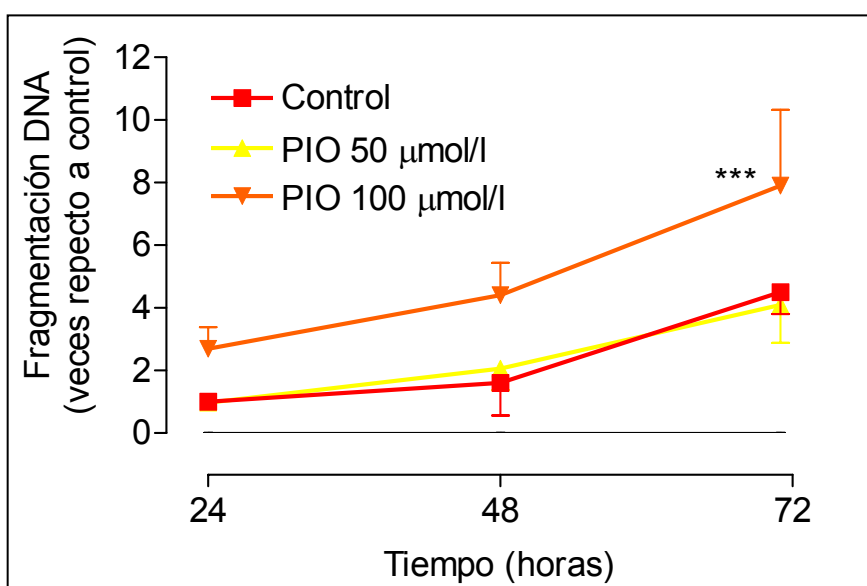


Figura 12: Efecto de la pioglitazona, a 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$, en la actividad apoptótica, media a las 24, 48 y 72 h como fragmentación de DNA.

*** $p < 0.001$

1.2.2. Fragmentación de DNA: efecto de TGF- β 1

Con objeto de corroborar la importancia del TGF- β 1 en el efecto apoptótico de la pioglitazona, se procedió a la medición de la actividad apoptótica de nuestro cultivo celular en respuesta a PIO 100 μ mol/l, en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, USA) a 50 μ g/ml, cuya eficacia, a esta concentración, en la inhibición de las acciones extracelulares de esta citoquina ha sido previamente descrita (Ivanov et al., 1998; Redondo et al., 2003).

Tanto a las 24, 48 o 72 h, el efecto apoptótico de la PIO resulta inhibido de forma estadísticamente significativa cuando el cultivo celular se co-incuba con el citado anticuerpo (Figura 13). De este modo, se observa la importancia del TGF- β 1 en el efecto apoptótico de la PIO a 100 μ mol/l en VSMC de rata.

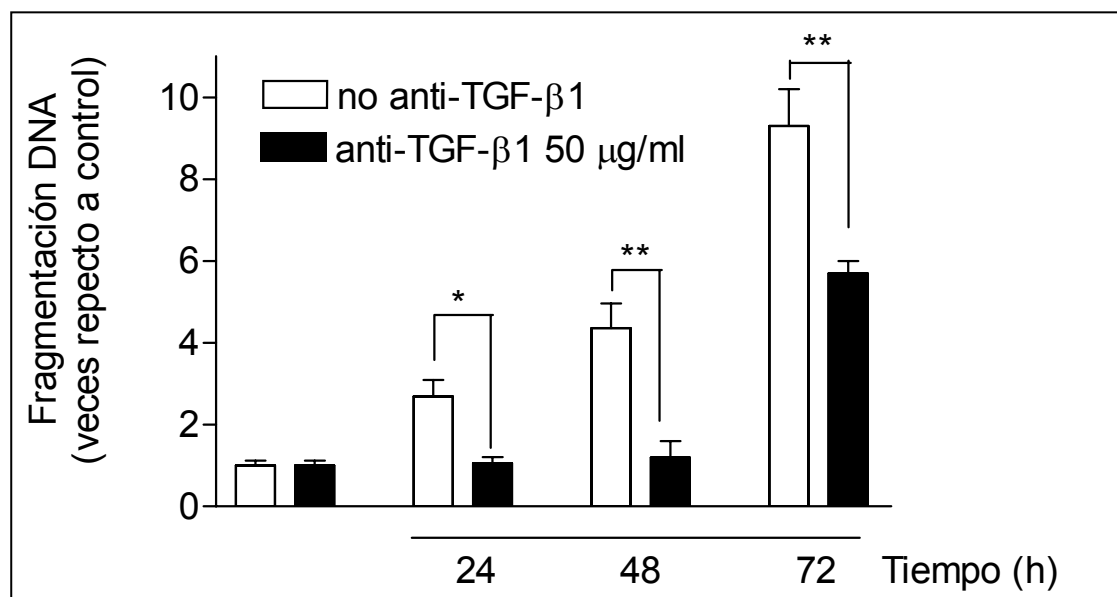


Figura 13: Papel del TGF- β 1 en el efecto apoptótico de la pioglitazona.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

1.2.3. Población celular hipoploide: efecto de PIO y TGF- β 1

Como método adicional de medición de la actividad apoptótica en el cultivo celular, se analizó la proporción de células en situación nuclear hipoploide (cantidad de DNA menor que el número haploide n). Estas células son detectadas por el citómetro de flujo como elementos en los que el núcleo se encuentra fragmentado, y por lo tanto, sufren el fenómeno de muerte celular por apoptosis.

De forma paralela a los resultados encontrados cuando se analiza la fragmentación de DNA, a 24 h, la pioglitazona a 100 $\mu\text{mol/l}$ eleva de forma significativa la proporción de células apoptóticas, siendo este efecto bloqueado por el anti-TGF- β 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 14).

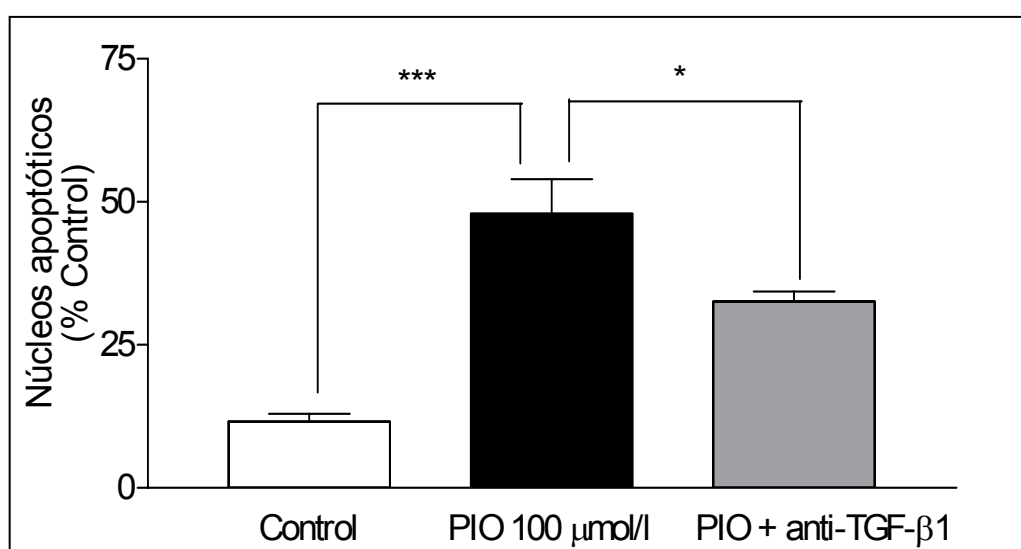


Figura 14: Efecto de la pioglitazona, en presencia o ausencia del anticuerpo bloqueante anti-TGF- β 1, sobre la proporción de células apoptóticas, medidas por citometría de flujo como elementos hipoploides.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$

1.2.4. Actividad de caspasa-3: efecto de PIO y TGF- β 1

Como método adicional de medición de la actividad apoptótica, se midió la actividad de la enzima caspasa-3, que es una vía final convergente de la cascada enzimática que acompaña al fenómeno de muerte celular programada. Esta actividad fue medida mediante un kit comercial de actividad de Caspasa-3 (Calbiochem, Schwabach, Alemania), correlacionado con la concentración total de proteínas, obtenida por el método del ácido bicinquinónico. Los resultados obtenidos, a las 24 h, se exponen en la Figura 15. El fármaco, a 100 $\mu\text{mol/l}$, tiene como efecto un aumento, estadísticamente significativo, de la actividad de Caspasa-3, siendo este efecto inhibido por el anticuerpo anti-TGF- β 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$.

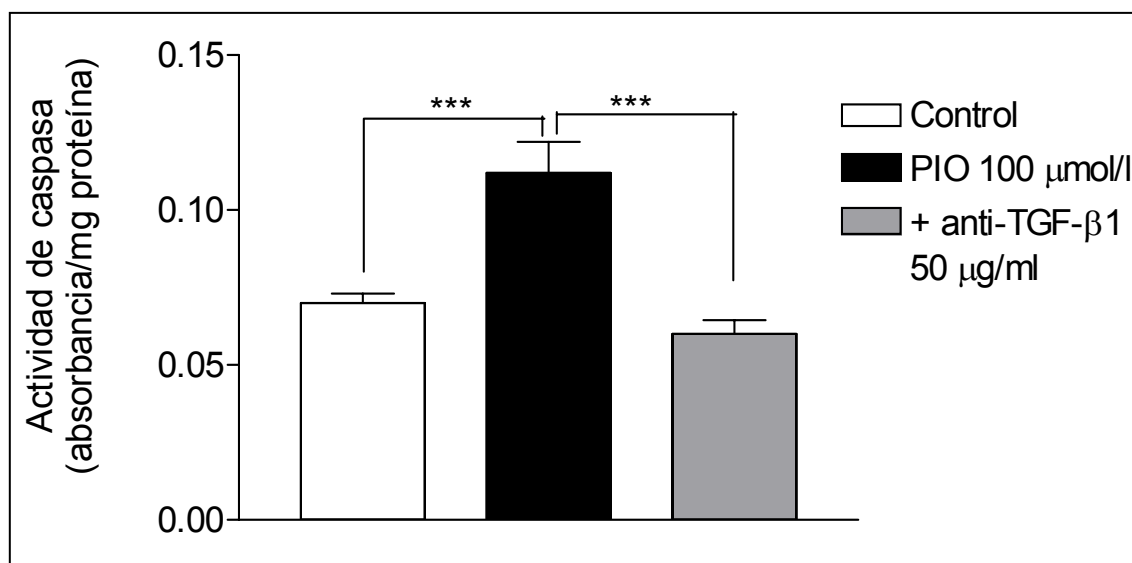


Figura 15: Efecto de la pioglitazona, en presencia o ausencia del anticuerpo bloqueante anti-TGF- β 1, sobre la actividad apoptótica, medida como actividad enzimática de la enzima proapoptótica caspasa-3.

*** $p < 0.001$

1.3. Secreción de TGF- β 1

1.3.1. Curva de tiempos de secreción de TGF- β 1

Como se aprecia en la Figura 16, la pioglitazona a 100 μ mol/l aumenta de forma significativa la secreción de TGF- β 1, medida como concentración de TGF- β 1 en el medio condicionado, mediante un kit comercial de TGF- β 1 (R&D Systems), correlacionado con la concentración total de proteínas presentes en el cultivo celular, obtenida con el método del ácido bicinquinónico, como se explica en Material y Métodos. El pico máximo de secreción de TGF- β 1, donde el fármaco alcanza un efecto significativo, es el de 30 min, como se aprecia en la gráfica.

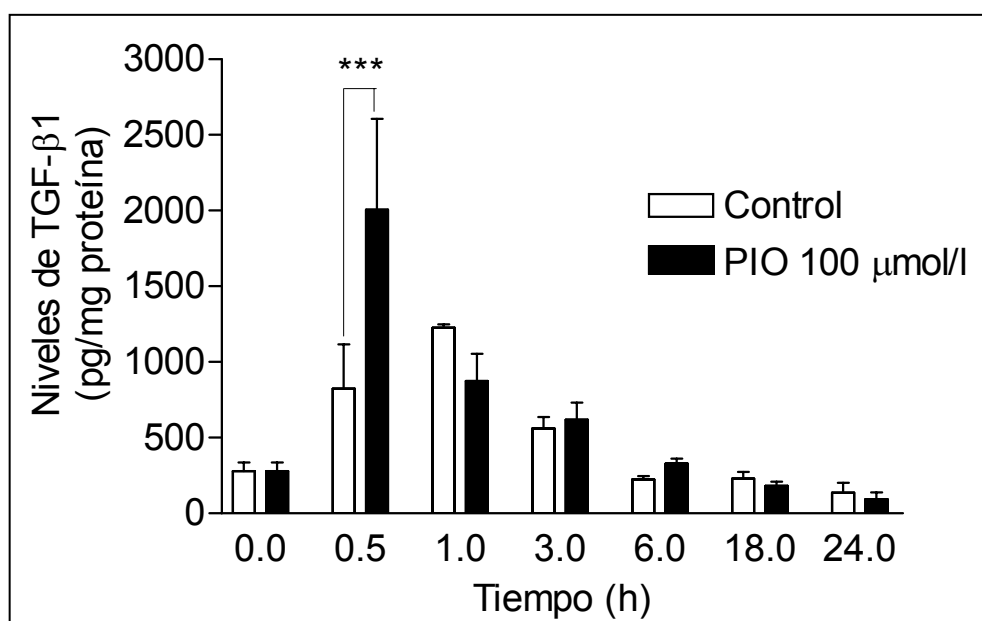


Figura 16: Curva de tiempos de secreción de TGF- β 1, en medio libre de suero, en presencia o ausencia de pioglitazona a 100 μ mol/l.

*** $p < 0.001$

1.3.2. Efecto del PPAR- γ en la secreción de TGF- β 1 mediada por pioglitazona

Dado que el fármaco en estudio eleva la secreción de TGF- β 1 a los 30 min, y es normalmente considerado como un agonista de la proteína PPAR- γ , tratamos de averiguar si este efecto estaba efectivamente mediado por PPAR- γ . Como se aprecia en la Figura 17, el inhibidor farmacológico de PPAR- γ GW9662 (Tocris, Bristol, Reino Unido), a la concentración de 2 μ mol/l, inhibió de forma significativamente el efecto del fármaco.

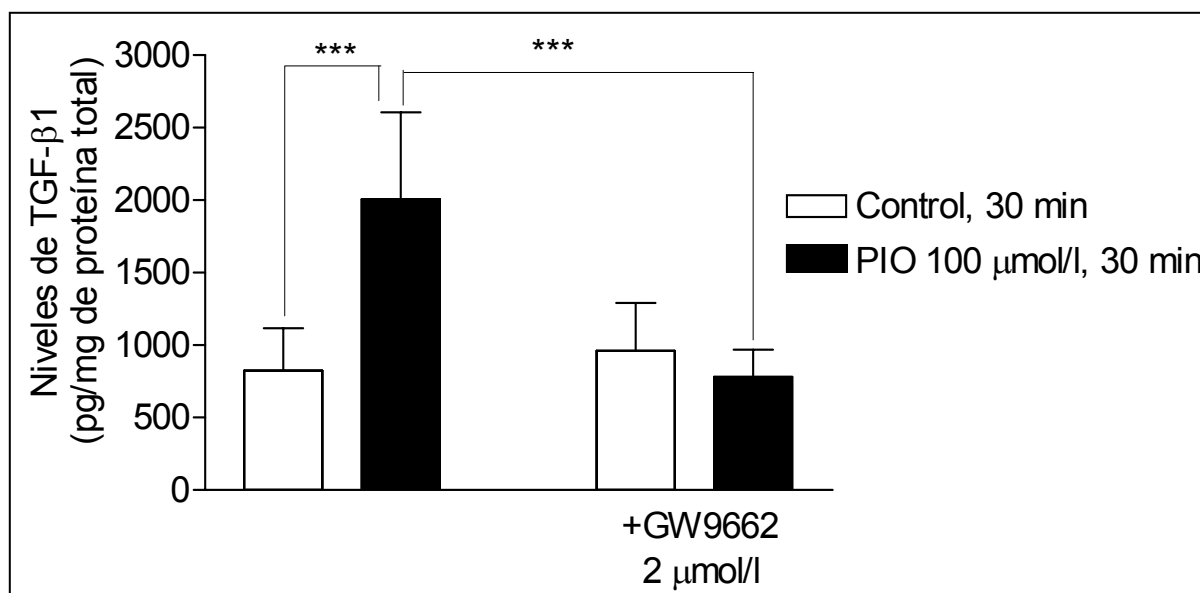


Figura 17: Efecto de la pioglitazona (100 μ mol/l) y del inhibidor específico de PPAR- γ GW9662 (2 μ mol/l), en la secreción de TGF- β 1 a los 30 min de incubación.

*** $p < 0.001$

1.3.3. Efecto biológico de la concentración de TGF- β 1 encontrada

Con el objetivo de dilucidar el efecto celular de la concentración hallada de TGF- β cuando se trata el cultivo con pioglitazona 100 μ mol/l durante 30 min, se incubaron las células en presencia o ausencia de esa citoquina a una concentración de 400 pg/ml, obtenida en el grupo de experimentos de ELISA de medio condicionado. Cuando la concentración obtenida tras incubar las células con pioglitazona a 100 μ mol/l durante 30 min (400 pg/ml) es añadida al cultivo, a las 24 h se observa un gran aumento de la apoptosis, medida como fragmentación de DNA. Del mismo modo, la adición del anticuerpo utilizado para bloquear esta citoquina (anti-TGF- β 1 a 50 μ g/ml) es asimismo capaz de antagonizar el efecto del TGF- β 1 añadido de forma exógena. Estos resultados se muestran en la Figura 18.

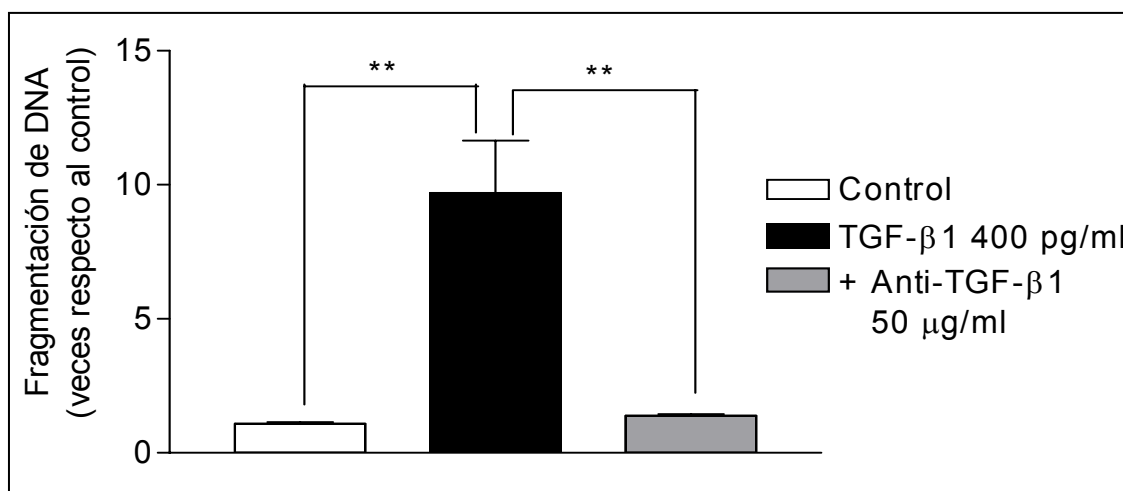


Figura 18: Acción fisiológica del TGF- β 1 añadido de forma exógena.

** $p < 0.01$

1.3.4. Efecto en la secreción de TGF- β 1 de la dPGJ2

La 15-deoxi-prostaglandina J2 alfa (15dPGJ2) es una prostaglandina cuyas funciones, entre otras, incluyen la actividad de agonismo de PPAR- γ y por lo tanto puede considerarse como un agonista endógeno de este receptor que no presenta la estructura molecular del anillo tiazolidinodiónico, característico de las tiazolidinodionas como la pioglitazona. Fue utilizado, por lo tanto, para corroborar la importancia del agonismo PPAR- γ en la secreción de TGF- β 1.

Como se observa en la Figura 19, la incubación con 15dPGJ2 a 5 μ mol/l aumentó de forma débil, pero significativa, la secreción de TGF- β 1 a los 30 min, un efecto que resulta de nuevo antagonizado por el antagonista de PPAR- γ GW9662 a 2 μ mol/l. De esta manera, la secreción de TGF- β 1 parece ser un mecanismo generado por el agonismo del receptor nuclear PPAR- γ .

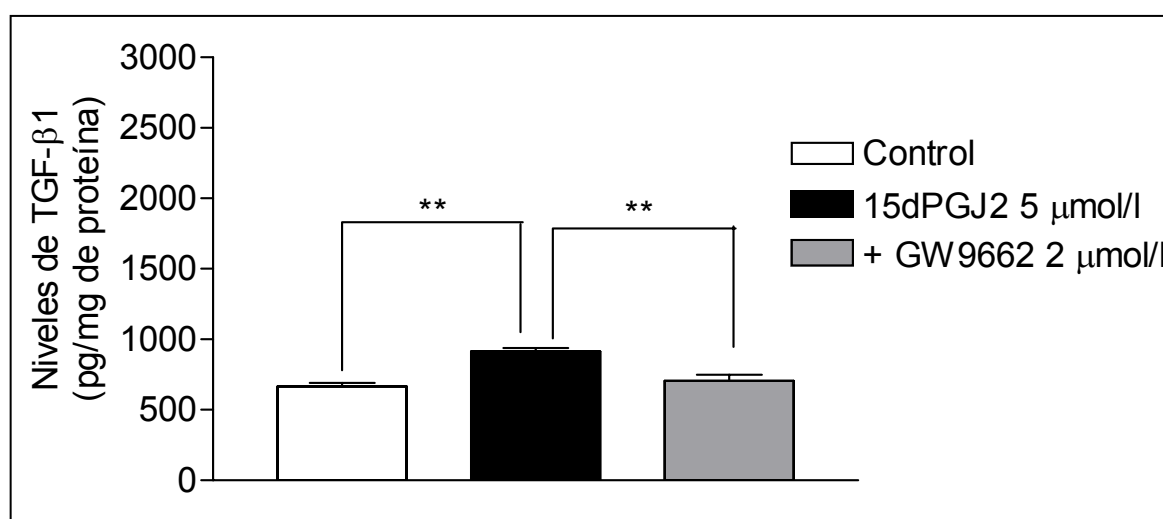


Figura 19: Efecto del agonista fisiológico no tiazolidinodiónico de PPAR- γ 15dPGJ2 (5 μ mol/l) en la secreción de TGF- β 1 a los 30 min. Acción del antagonista de PPAR- γ GW9662 (2 μ mol/l) sobre este efecto.

** $p < 0.01$

1.4. Señalización por Smad2

1.4.1. Efectos de PIO y PPAR- γ en la señalización por Smad2

La proteína Smad2 pertenece a una familia de proteínas relacionadas con la señalización intracelular del TGF- β 1 y otras moléculas. Dado que esta proteína se activa por fosforilación, siendo posteriormente transportada al núcleo celular y regulando allí la expresión génica, procedimos al estudio de la señalización de Smad2 mediante localización de la fracción fosforilada (pSmad2) por microscopía confocal.

Como se aprecia en la Figura 20, en las microfotografías de arriba, la pioglitazona (a una concentración de 100 μ mol/l) induce un aumento en el reclutamiento nuclear de pSmad2 a los 30 min, tiempo que se corresponde con el de mayor secreción de TGF- β 1 encontrada en el grupo de resultados de ELISA de TGF- β 1 que acabamos de describir en el apartado 1.3. Este reclutamiento nuclear, en la cuantificación de la fluorescencia de las imágenes, alcanza la significación estadística (Figura 21).

Resulta interesante el hallazgo de que, acorde a lo encontrado en la secreción de TGF- β 1, este reclutamiento nuclear de pSmad2 es dependiente de PPAR- γ , al resultar de nuevo antagonizado por el antagonista de PPAR- γ GW9662 (2 μ mol/l). Esos resultados se aprecian en la Figura 22.

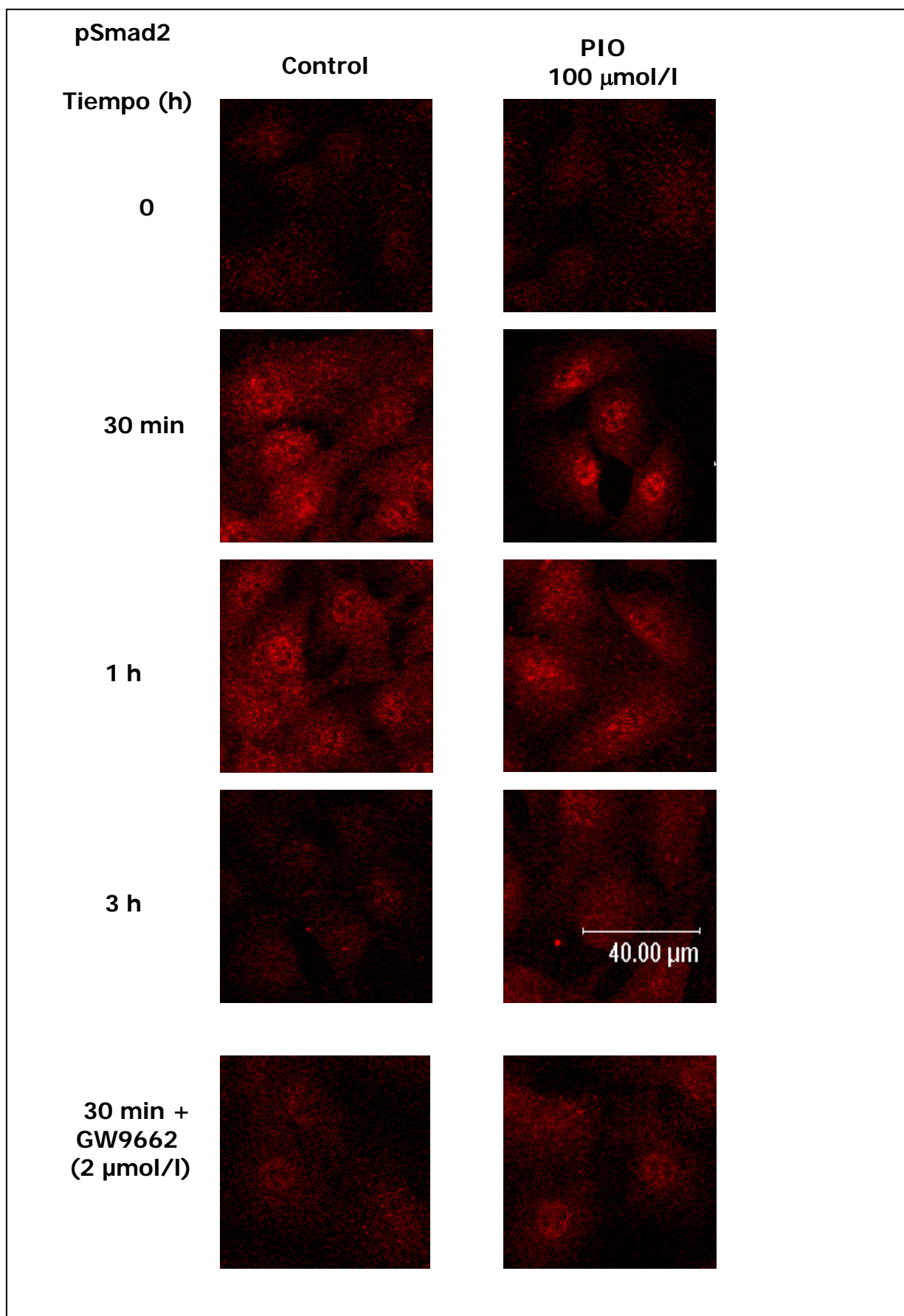


Figura 20: Curva de tiempos de internalización nuclear de pSmad2, detectada por inmunofluorescencia confocal de células fijadas. Se aprecia un claro reclutamiento nuclear de la proteína, inducido por pioglitazona a 100 $\mu\text{mol/l}$, a los 30 min. Este efecto resulta inhibido con el inhibidor de PPAR- γ GW9662 a 2 $\mu\text{mol/l}$, demostrando la importancia del citado receptor nuclear en este contexto.

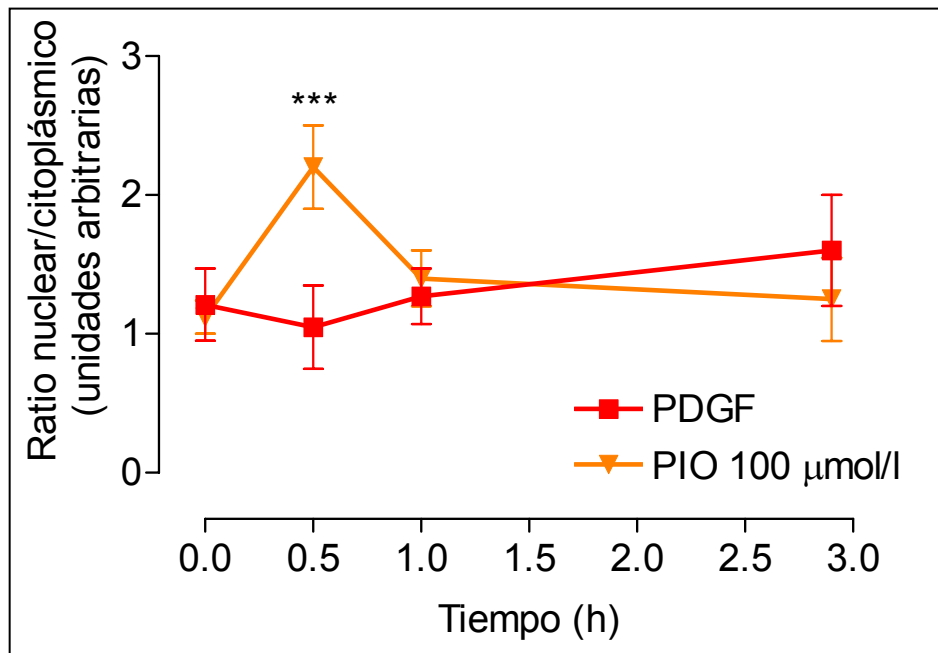


Figura 21: Cuantificación de la fluorescencia de las imágenes de microscopía confocal. La intensidad de la tinción en el núcleo celular respecto al citoplasma experimenta una elevación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) cuando a las células se les añade pioglitazona a 100 µmol/l, a un tiempo de 30 min.

*** $p < 0.001$

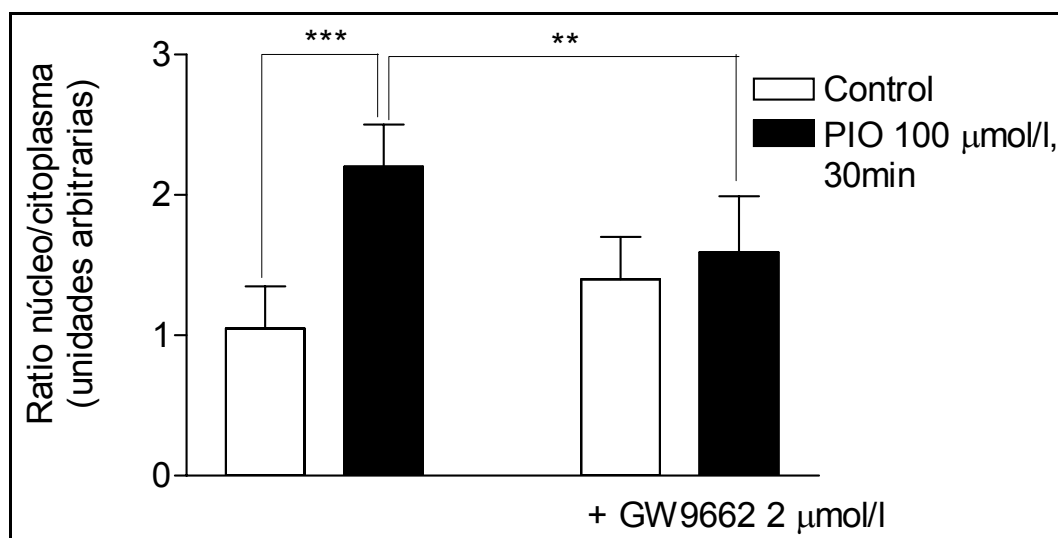


Figura 22: Papel del PPAR- γ en el reclutamiento nuclear de pSmad2 (30 min). Se observa una inhibición del efecto del fármaco (pioglitazona, 100 $\mu\text{mol/l}$) cuando el cultivo celular se incubaba con el antagonista de PPAR- γ GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$).

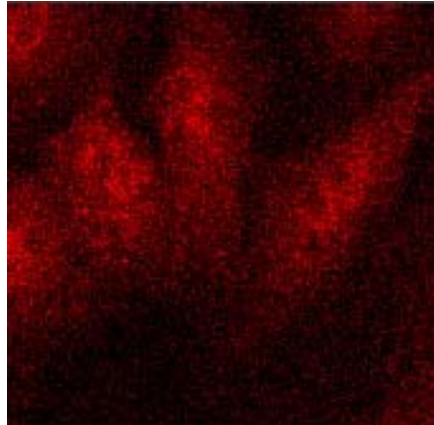
$**p < 0.01$, $***p < 0.001$

1.4.2. Efecto del TGF- β 1 en la señalización por Smad2 inducida por pioglitazona

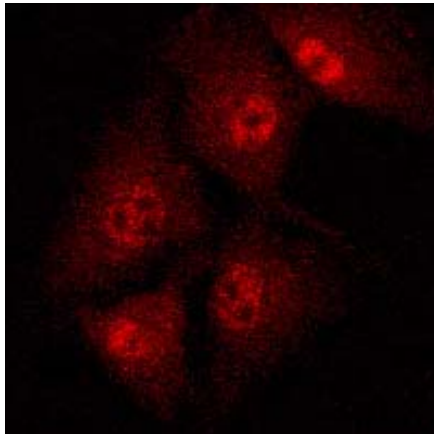
Hemos descrito hasta ahora un efecto de la pioglitazona a 100 μ mol/l en el aumento tanto en la secreción de TGF- β 1 como en el reclutamiento nuclear de pSmad2, siendo ambos efectos dependientes de PPAR- γ y teniendo lugar a los 30 min de incubación con el fármaco. Dado que se ha descrito que algunas activaciones de las proteínas Smads pueden llevarse a cabo de forma independiente de la secreción de TGF- β 1 (Rodríguez-Vita et al., 2005), tratamos de comprobar si el efecto que se observó en el reclutamiento nuclear de pSmad2 tiene o no lugar de forma dependiente de TGF- β 1. Como muestra la Figura 23, la adición del anticuerpo anti-TGF- β 1 (50 μ g/ml) al medio con pioglitazona 100 μ mol/l es capaz de inhibir el efecto del fármaco en el reclutamiento nuclear de pSmad2. Al realizar la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia nuclear *versus* citoplasmática (Figura 24), encontramos que el efecto del anti-TGF- β 1 sobre el efecto del fármaco alcanza significación estadística. De este modo, cobra sentido la idea de una secuencia PIO, PPAR- γ , TGF- β 1, pSmad2 y apoptosis de VSMC de rata.

**pSmad2
(30 min)**

Control



PIO 100 μ mol/l



**PIO 100 μ mol/l
+ anti-TGF- β 1
50 μ g/ml**

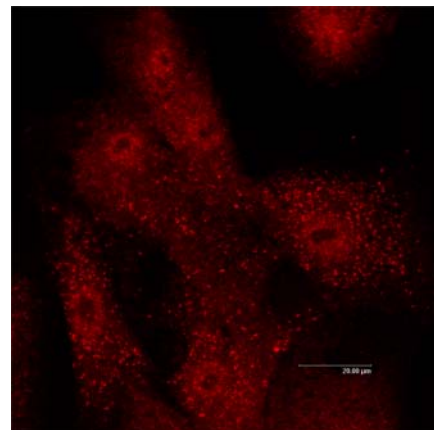


Figura 23: En las microfotografías se aprecia el reclutamiento nuclear de pSmad en presencia de pioglitazona 100 $\mu\text{mol/l}$ a los 30 min, resultando inhibido este efecto al coincubarse el fármaco con el anticuerpo bloqueante anti-TGF- β 1 (50 $\mu\text{g/ml}$).

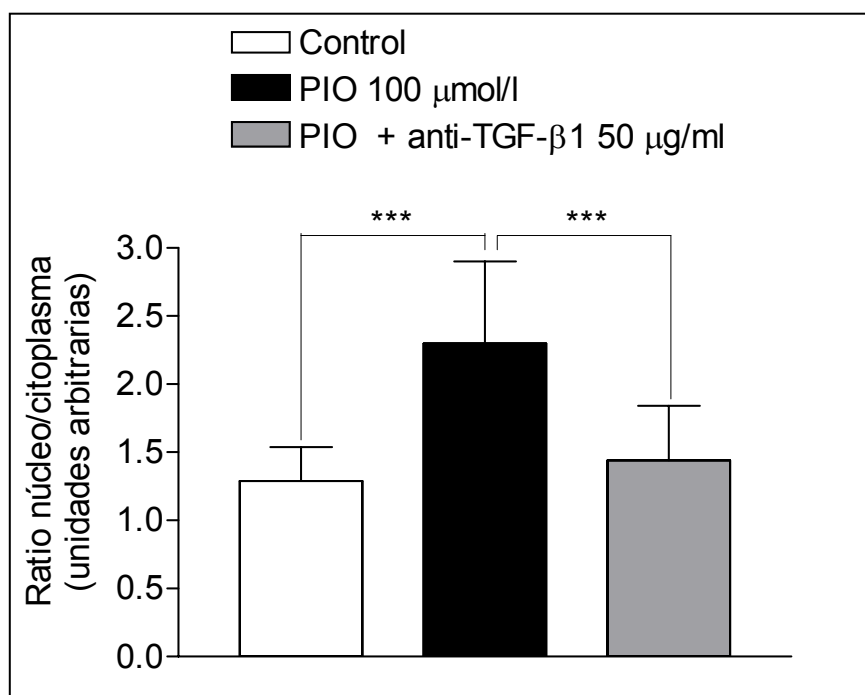


Figura 24: El análisis de la fluorescencia nuclear *versus* citoplasmática de pSmad2 denota un aumento significativo en el reclutamiento nuclear de la proteína a los 30 min en presencia de pioglitazona a 100 µmol/l. Este efecto resulta inhibido de forma estadísticamente significativa al coincubar el fármaco con el anticuerpo bloqueante anti-TGF-β1 (50 µg/ml).

*** $p < 0.001$

2. EFECTOS SOBRE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE PACIENTES

Los datos clínicos de la cohorte de pacientes en los que se llevó a cabo el estudio se muestran en la Tabla 1.

	No diabéticos	Diabéticos	<i>p</i>
n	10	9	
Edad	61.9±11.4	65.7±11.7	0.84*
Género (♂/♀)	8/2	5/4	0.67 [§]
Índice de Masa Corporal (kg/m ²)	27.8±3.3	25.1±4.3	0.1*
Colesterol total (mg/dl)	210.8±44.6	164.0±36.6	0.03*
LDL (mg/dl)	129.3±41.1	92.8±26.7	0.1*
HDL (mg/dl)	47.3±8.1	36.0±8.3	0.037*
Triglicéridos (mg/dl)	150.8±52,6	174.0±57.0	0.4*
Glucosa (mg/dl)	97.8±34.4	158.0±42.9	0.01*
Hemoglobina glicada	No medida	7.3±0.8	-
Hipertensión (N/%)	3/33	6/66	0.15 [#]
Fumadores (%)	5/50	3/33	0.56 [#]

Tabla 1: Características clínicas y bioquímicas de los pacientes estudiados.

BMI: índice de masa corporal. NA: no analizado. § Test de Fischer. # Chi-cuadrado. *t de Student.

2.1. Efectos sobre la proliferación celular

Se procedió al análisis de la capacidad proliferativa (síntesis de DNA, medido como incorporación de la falsa base BrdU), de pacientes diabéticos y no diabéticos con concentraciones crecientes de glucosa (5 y 15 mmol/l de glucosa) Los resultados se muestran en la Figuras 25 y 26. La única comparación que resulta estadísticamente significativa muestra una inhibición de la síntesis de DNA en las VSMC de pacientes no diabéticos (Figura 25) en condiciones de normoglucemia (5 mmol/l), cuando se incuban con pioglitazona a 10 µmol/l.

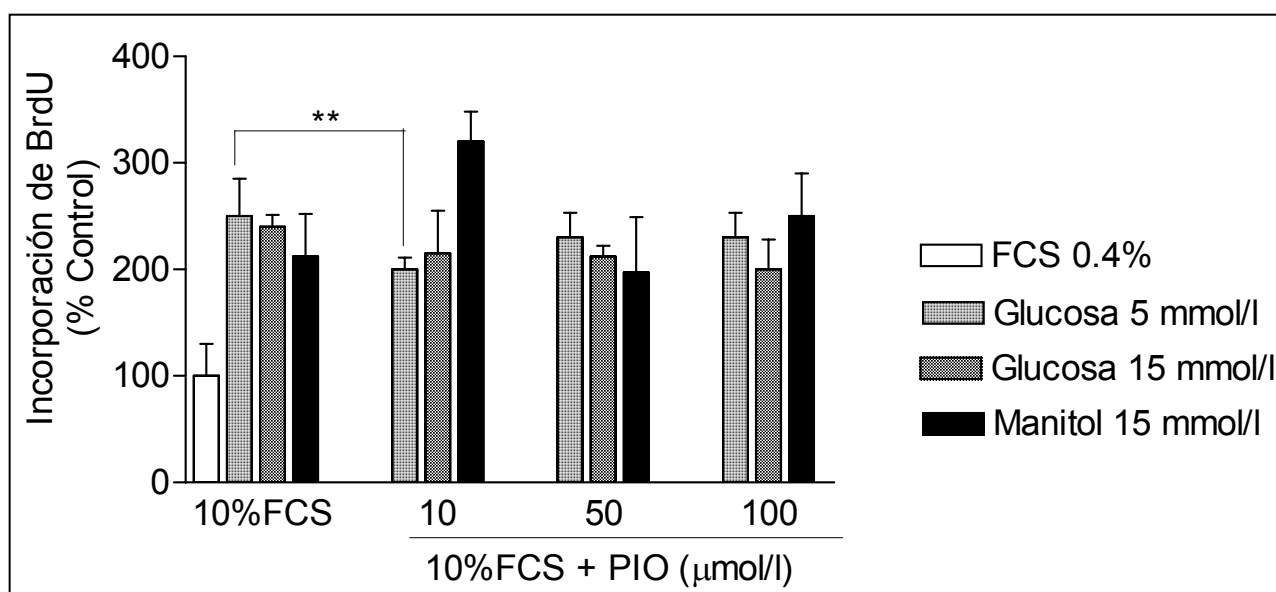


Figura 25: Síntesis de DNA en VSMC de pacientes no diabéticos en presencia o ausencia de pioglitazona (10, 50 y 100 µmol/l), y en concentraciones crecientes de glucosa (5 ó 15 mmol/l). La síntesis de DNA se midió como incorporación de BrdU a las 19 h, como se indica en Material y Métodos.

****** $p < 0.01$

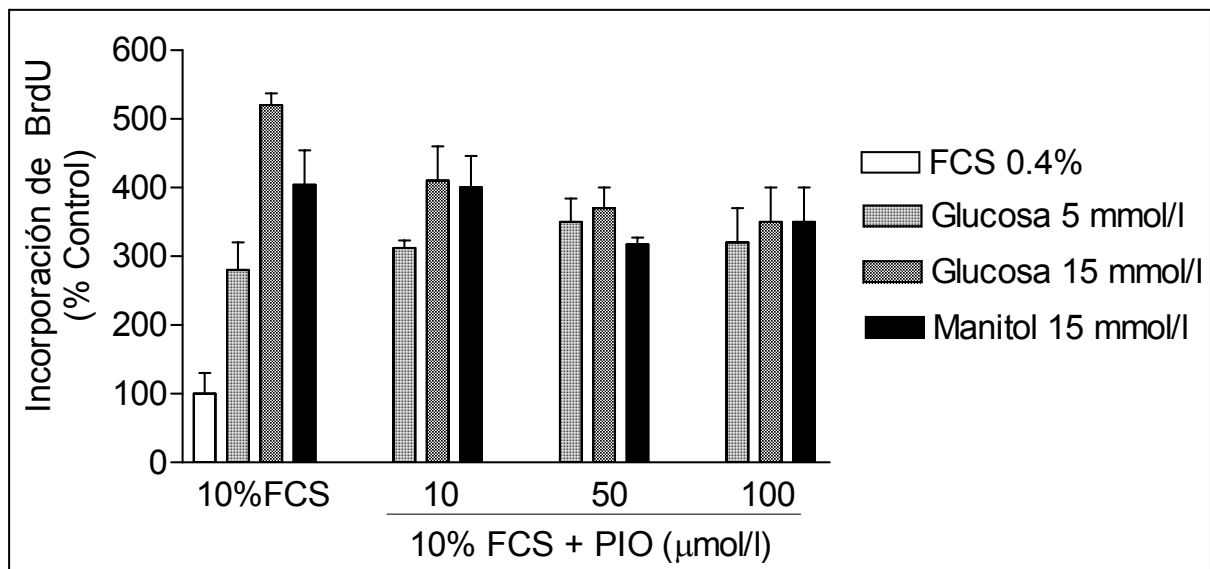


Figura 26: Síntesis de DNA en VSMC de pacientes diabéticos en presencia o ausencia de pioglitazona (10, 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$), y en concentraciones crecientes de glucosa (5 ó 15 mmol/l). La síntesis de DNA se midió como incorporación de BrdU a las 19 h.

2.2. Efectos sobre la apoptosis

2.2.1. Efecto apoptótico de la pioglitazona en concentraciones normoglucémicas

En condiciones normoglucémicas (medio RPMI con 5 mmol/l de glucosa), las concentraciones crecientes de pioglitazona (10, 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$, no producen en ningún caso un aumento significativo de la actividad apoptótica, ni en pacientes diabéticos ni en los no diabéticos (Figura 27).

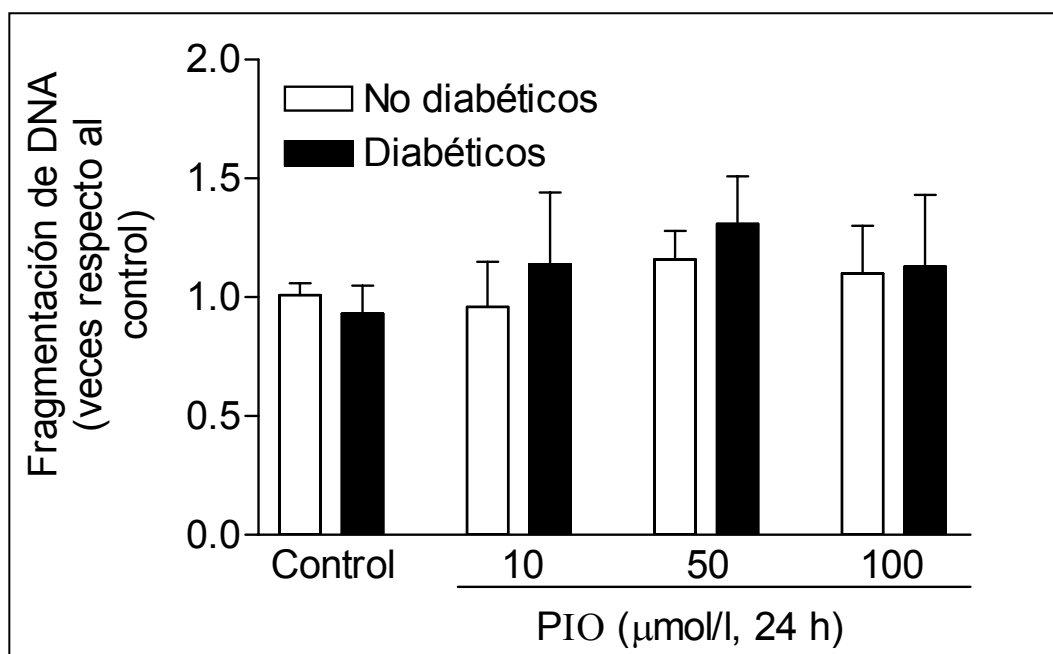


Figura 27: Efecto de la pioglitazona (10, 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$), en la actividad apoptótica en condiciones normoglucémicas (5 mmol/l). La apoptosis fue medida como índice de fragmentación de DNA a las 24 h, como se describe en Material y Métodos. El fármaco no poseyó un efecto significativo ni en los pacientes diabéticos ni en los no diabéticos.

2.2.2. Efecto apoptótico de la pioglitazona en presencia de concentraciones crecientes de glucosa

En discordancia con los efectos observados en concentraciones normales de glucosa, la pioglitazona, a la concentración de 100 $\mu\text{mol/l}$, aumenta la apoptosis cuando las células se incuban con concentraciones superiores de glucosa (15 y 25 mmol/l). Es interesante comprobar que este efecto tiene lugar en VSMC procedentes tanto de pacientes no diabéticos (Figura 28) como de los que sufren diabetes mellitus tipo 2 (Figura 29).

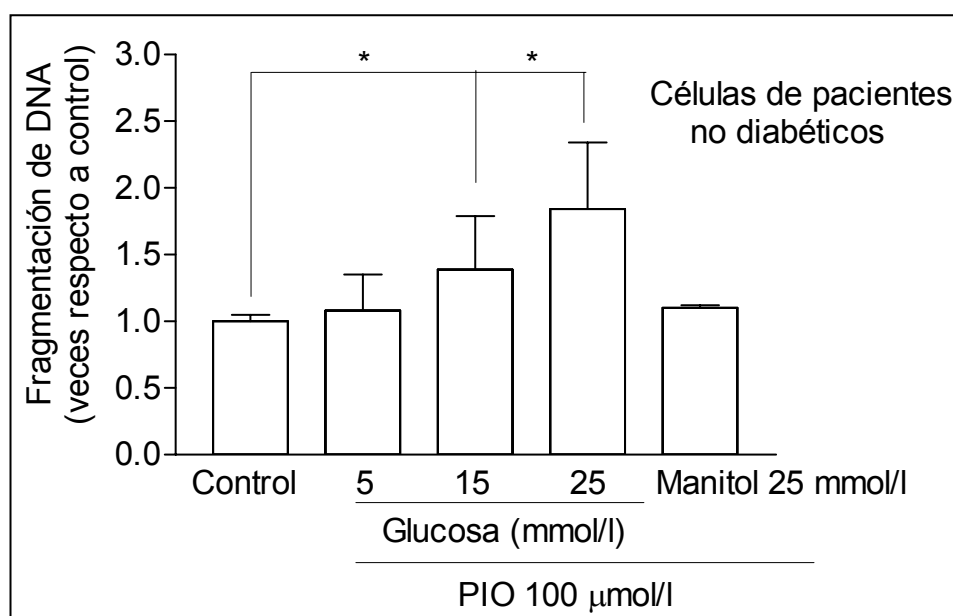


Figura 28: Efecto apoptótico de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$), sobre VSMC de pacientes no diabéticos. La apoptosis se midió como fragmentación de DNA a las 24 h, como se establece en Material y Métodos. El manitol (25 mmol/l) fue utilizado como control de osmolaridad. Se aprecia un aumento significativo del índice apoptótico cuando se incubaba con 15 o 25 mmol/l de glucosa.

* $p < 0.05$

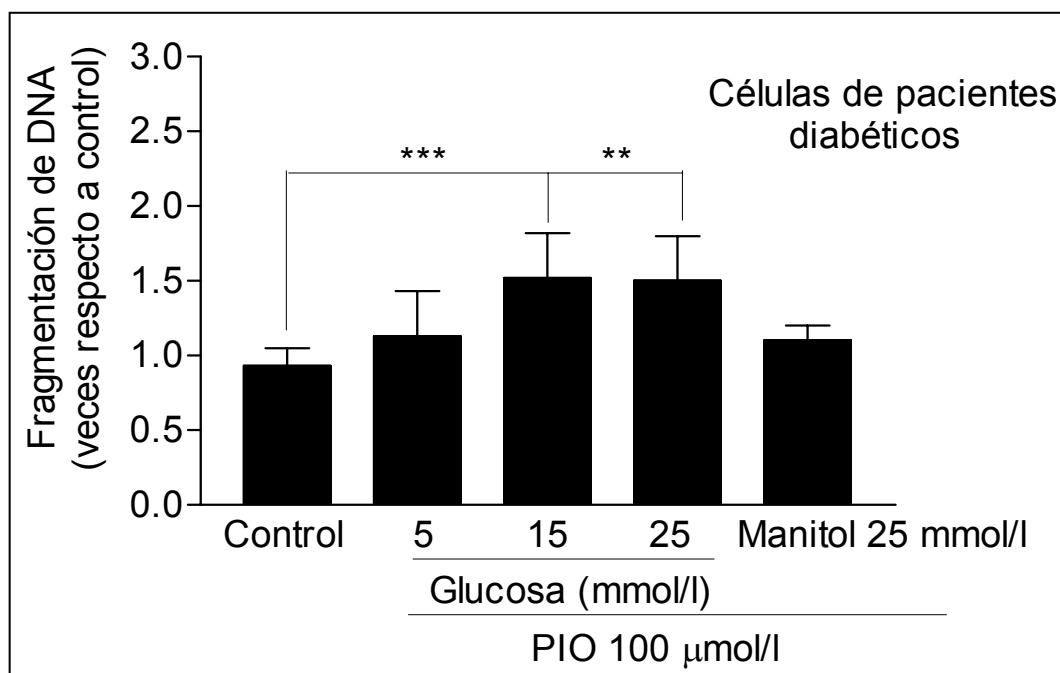


Figura 29: Efecto apoptótico de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$), sobre VSMC de pacientes diabéticos. La apoptosis se midió como fragmentación de DNA a las 24 h, como se establece en Material y Métodos. El manitol (25 mmol/l) fue utilizado como control de osmolaridad. Se aprecia un aumento significativo del índice apoptótico cuando las células se incuban en un medio con 15 o 25 mmol/l de glucosa.

**** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$**

2.2.3. Efecto de la vía TGF- β 1/ALK-4/5/7 en el efecto apoptótico de la pioglitazona

En el apartado anterior de resultados se comprobó la importancia de la vía del TGF- β 1 y pSmad2 en el efecto apoptótico de la pioglitazona sobre VSMC de rata. Por ello, consideramos plausible el averiguar si los efectos que acabamos de describir en VSMC humanas pueden ser debidos a la citada vía de señalización celular. Dado que en el tiempo de realización de esta serie de experimentos comenzaron a salir al mercado varios inhibidores farmacológicos específicos de ciertas vías del TGF- β 1, obtuvimos valiosas herramientas que nos permitieron profundizar en el mecanismo de acción. Concretamente, como ya se ha comentado en el apartado de Introducción, la vía del receptor de TGF- β ALK-4/5/7 parece ser el nexo de unión entre esta citoquina y la proteína señalizadora pSmad2 (Redondo et al., 2007). De este modo, en este grupo de experimentos, la inhibición del TGF- β 1 se realizó con el inhibidor farmacológico SB-431542 (Tocris, Bristol, Reino Unido), cuya potencia y especificidad en la inhibición de ALK-4/5/7 a 10 μ mol/l ya ha sido ampliamente descrita (Inman et al., 2002).

El SB-431542 (10 μ mol/l) es capaz de inhibir el efecto apoptótico de la pioglitazona (100 μ mol/l, 24 h de incubación) con 15 o 25 mmol/l, tanto en VSMC de pacientes no diabéticos (Figura 30) como de diabéticos (Figura 31).

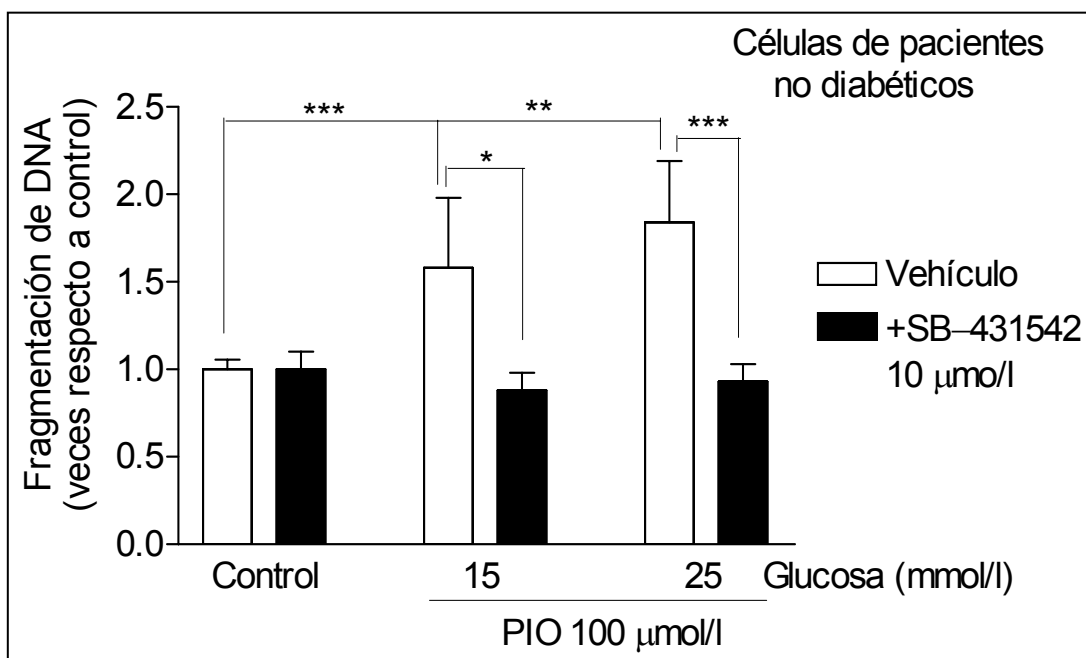


Figura 30: Efecto del inhibidor del receptor de TGF- β 1 (SB-431542, 10 μ mol/l), en el efecto apoptótico inducido por pioglitazona (100 μ mol/l), en concentraciones de glucosa de 15 y 25 mmol/l, sobre VSMC de pacientes no diabéticos. El SB-431542 es capaz de inhibir de forma significativa el efecto del fármaco. La apoptosis se midió como fragmentación de DNA a las 24 h.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

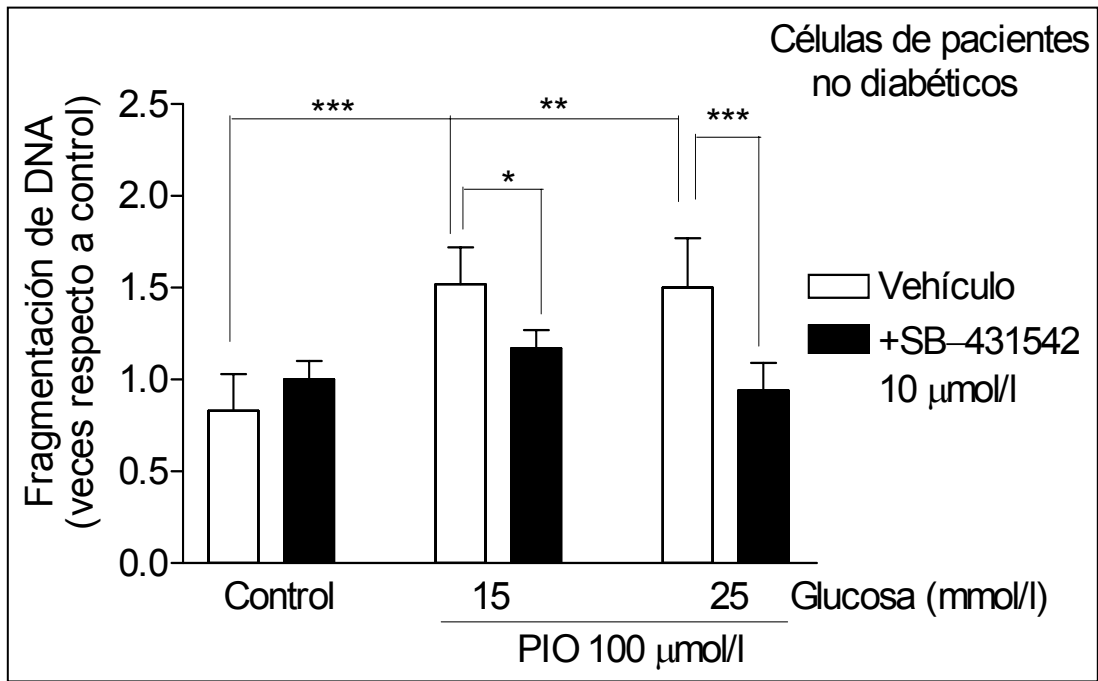


Figura 31: Efecto del inhibidor del receptor de TGF- β 1 (SB-431542, 10 μ mol/l), en el efecto apoptótico inducido por pioglitazona (100 μ mol/l), en concentraciones de glucosa de 15 y 25 mmol/l, sobre VSMC de pacientes diabéticos. El SB-431542 es capaz de inhibir de forma significativa el efecto del fármaco.

*p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001

2.3. Efectos sobre la secreción de TGF- β 1

2.3.1. Secreción de TGF- β 1 en pacientes no diabéticos

Con el objeto de medir la secreción de TGF- β 1 inducida por pioglitazona (100 μ mol/l, la concentración con efecto apoptótico), se midió la concentración de TGF- β 1 mediante ELISA de medio condicionado, en condiciones de 15 mmol/l de glucosa, donde el fármaco presenta un efecto apoptótico (apartado 2.2.2).

En pacientes no diabéticos, se encontró que sus VSMC segregaban TGF- β 1 en presencia de pioglitazona (100 μ mol/l), alcanzándose un aumento significativo a los 30 min (Figura 32).

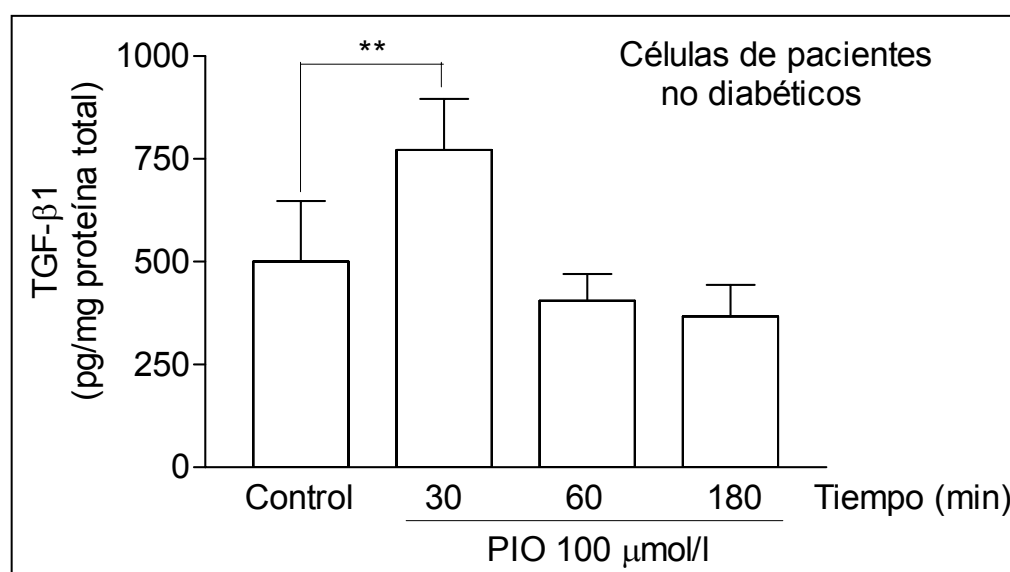


Figura 32: Efecto de la pioglitazona (100 μ mol/l, en 15 mmol/l de glucosa), sobre la secreción de TGF- β 1, medida con la técnica de ELISA de medio condicionado de VSMC de pacientes no diabéticos. Se observa un incremento a los 30 min, que alcanza significación estadística.

** $p < 0.01$

2.3.2. Secreción de TGF- β 1 en pacientes diabéticos

En pacientes diabéticos, se encontró que sus VSMC segregaban TGF- β 1 en presencia de pioglitazona (100 μ mol/l), alcanzándose aumentos significativos en los tiempos 30 min y 1 h. Se aprecia que el pico máximo se alcanza a 1 h, existiendo un cierto retraso con respecto a los no diabéticos (Figura 33).

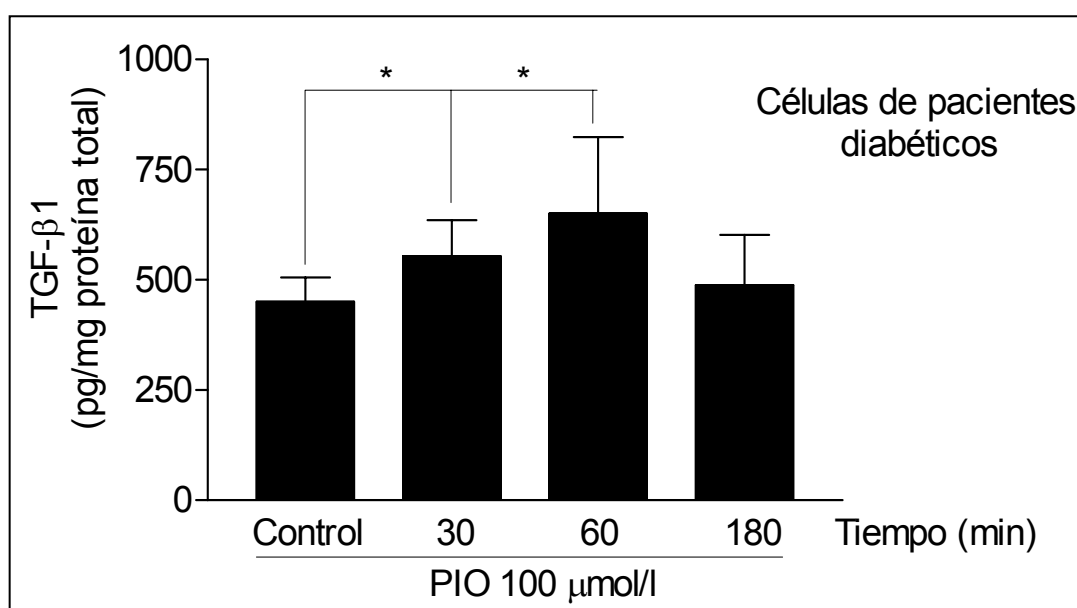


Figura 33: Efecto de la pioglitazona (100 μ mol/l, en 15 mmol/l de glucosa), sobre la secreción de TGF- β 1, medida con la técnica de ELISA de medio condicionado de VSMC de pacientes diabéticos. Se observa un incremento a los 30 min, que alcanza significación estadística.

****** $p < 0.05$

2.4. Efectos de la pioglitazona sobre la localización de pSmad2

Los efectos de la pioglitazona en el reclutamiento nuclear de pSmad2 se detallan en la Figura 34:

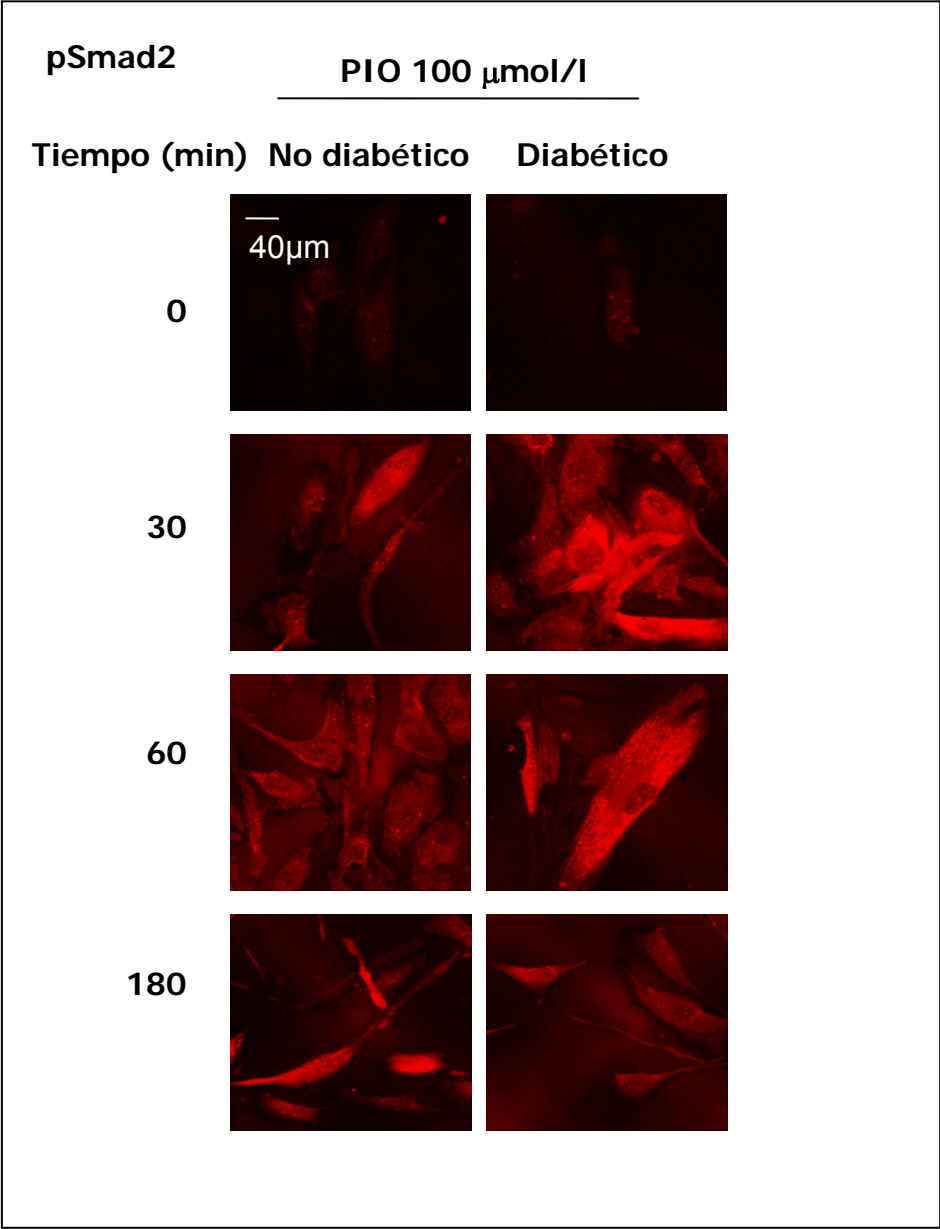


Figura 34: Curva de tiempos de los efectos de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$), en medio con glucosa 15 mmol/l de glucosa, en la localización de pSmad2. Las muestras se analizaron por microscopía confocal.

2.4.1. Intensidad citosólica en pacientes no diabéticos

Debido a que en VSMC humanas, la morfología de las microfotografías presenta una mayor tinción citoplasmática, esto permite el análisis cuantitativo por separado.

Al procederse al análisis cuantitativo y estadístico de las intensidades de fluorescencia, encontramos un aumento en la intensidad citosólica de pSmad2 en VSMC de pacientes no diabéticos, al ser incubadas en pioglitazona, en medio con 15 mmol/l de glucosa, en los tiempos de 30, 60 y 180 min. En los tres tiempos, el aumento resulta ser estadísticamente significativo, alcanzándose el pico máximo a los 180 min (Figura 35).

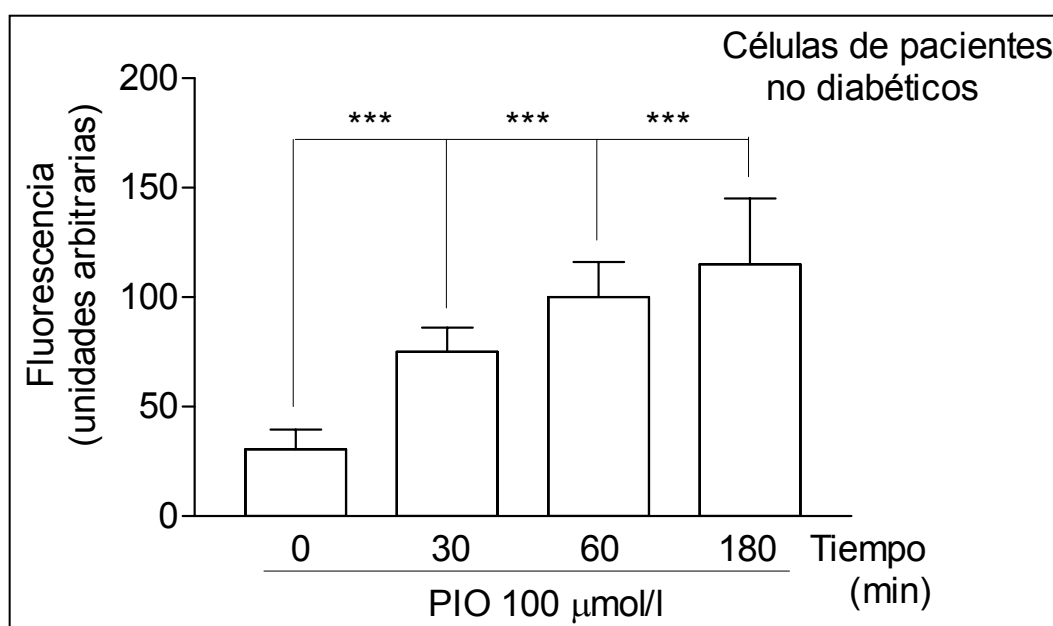


Figura 35: Efecto de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$, en medio con glucosa a 15 mmol/l) sobre la intensidad de la fluorescencia citosólica de pSmad2 en VSMC de pacientes no diabéticos.

*** $p < 0.001$

2.4.2. Intensidad citosólica en pacientes diabéticos

El análisis de este parámetro indica un aumento en la intensidad citosólica de pSmad2 de VSMC de pacientes diabéticos al ser incubados con pioglitazona, 100 $\mu\text{mol/l}$, en medio con glucosa a 15 mmol/l . Se obtiene un aumento estadísticamente significativo a los 30, 60 y 180 min. El pico máximo se alcanzó a los 30 min (Figura 36).

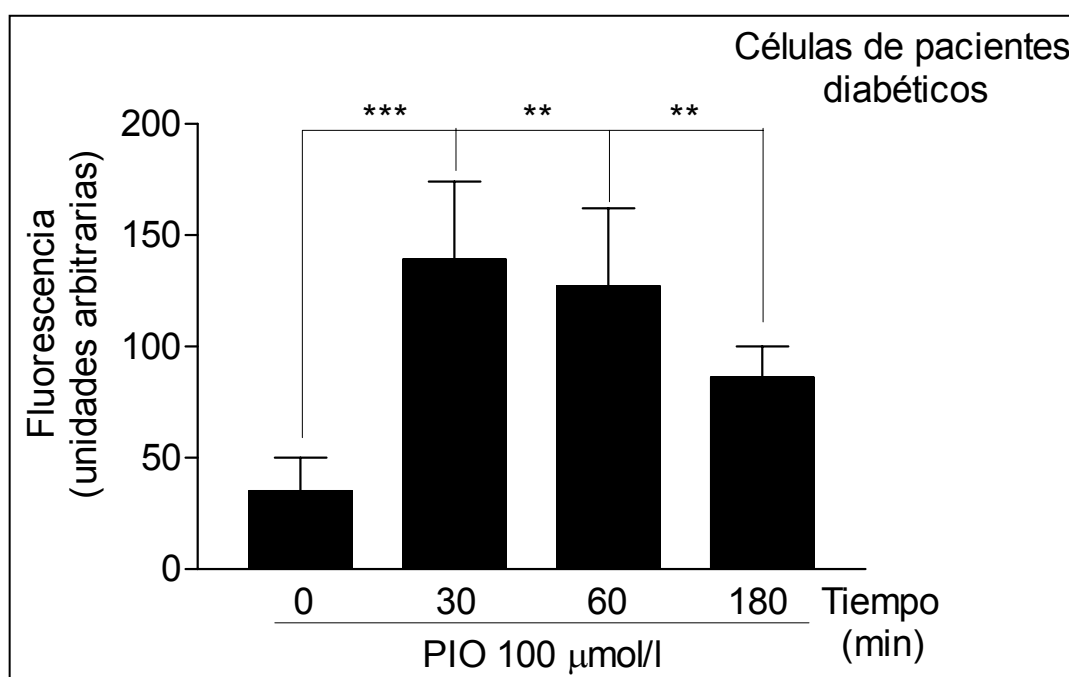


Figura 36: Efecto de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$, en medio con glucosa a 15 mmol/l) sobre la intensidad de la fluorescencia citosólica de pSmad en VSMC de pacientes diabéticos.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2.4.3. Intensidad nuclear en pacientes no diabéticos

Resultados similares produce el análisis de la intensidad nuclear. En pacientes no diabéticos, se encuentra del mismo modo un aumento en la intensidad nuclear en los tres tiempos, en respuesta a la incubación en presencia o ausencia de 100 $\mu\text{mol/l}$ de pioglitazona en un medio con 15 mmol/l de glucosa (Figura 37).

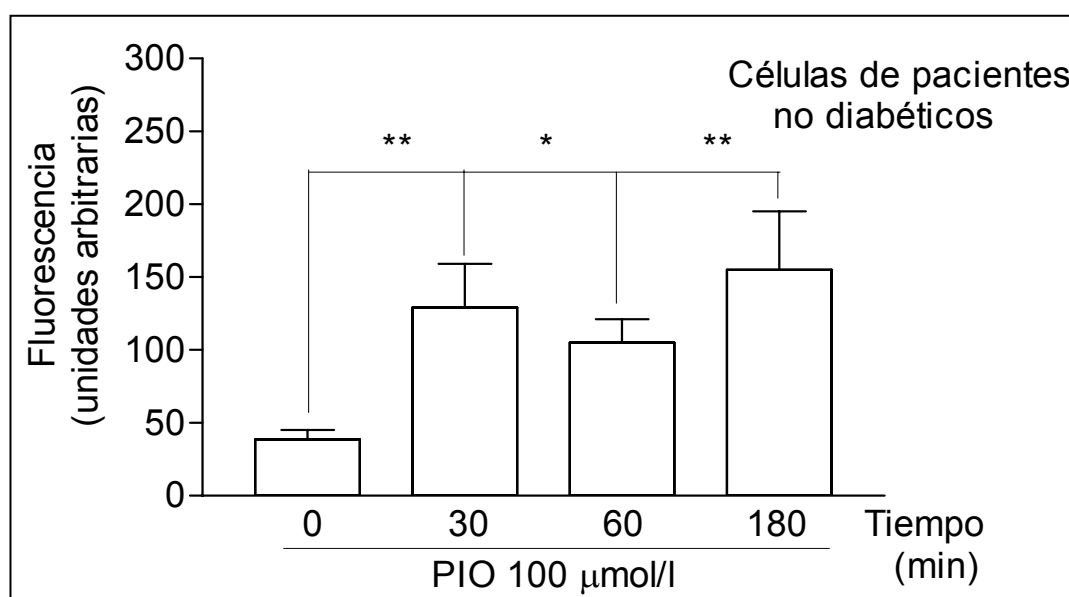


Figura 37: Efecto de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$), o control (tiempo 0), todo ello en medio con 15 mmol/l de glucosa, sobre la intensidad de la señal nuclear de pSmad2.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.4.4. Intensidad nuclear en pacientes diabéticos

En el análisis obtenido a partir del material de los pacientes diabéticos, se encuentra también un aumento significativo en la intensidad nuclear en los tres tiempos, en respuesta a la incubación en presencia o ausencia de 100 $\mu\text{mol/l}$ de pioglitazona en un medio con 15 mmol/l de glucosa (Figura 38).

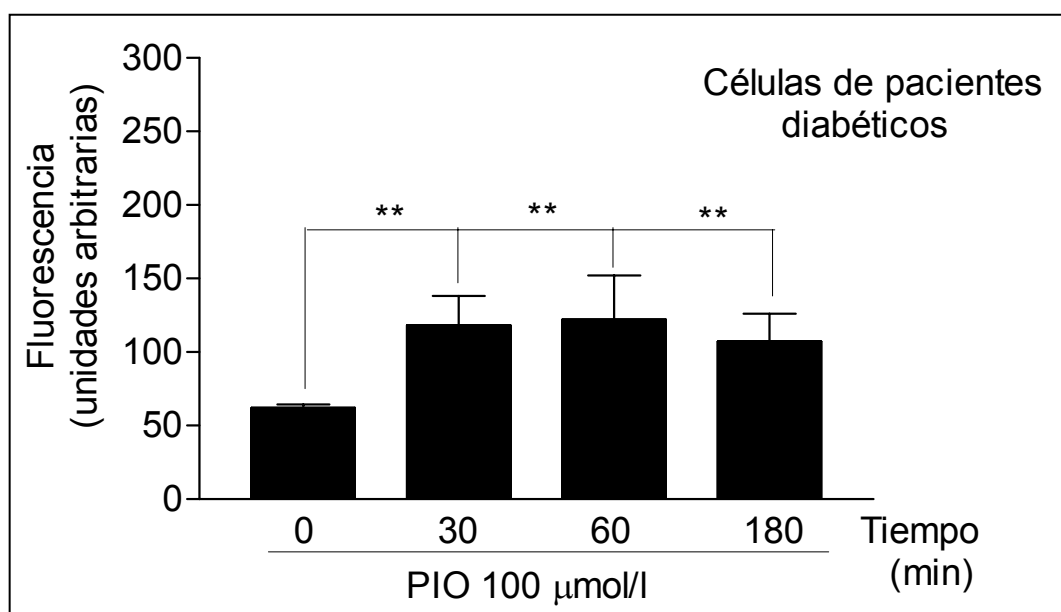


Figura 38: Efecto de la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$), o control (tiempo 0), todo ello en medio con 15 mmol/l de glucosa, sobre la intensidad de la señal nuclear de pSmad2.

****** $p < 0.01$

2.5. Papel del PPAR- γ y del TGF- β 1 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización de pSmad2

La localización de pSmad2, obtenida por microscopía confocal, se muestra en la Figura 39. Como se aprecia en las microfotografías, la visualización de pSmad2 inducida por pioglitazona a 100 $\mu\text{mol/l}$ (medio con 15 mmol/l de glucosa), se encuentra fuertemente disminuida cuando al fármaco se le añaden los inhibidores de ALK-4/5/7 SB-431542 (10 $\mu\text{mol/l}$), o de PPAR- γ GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$).

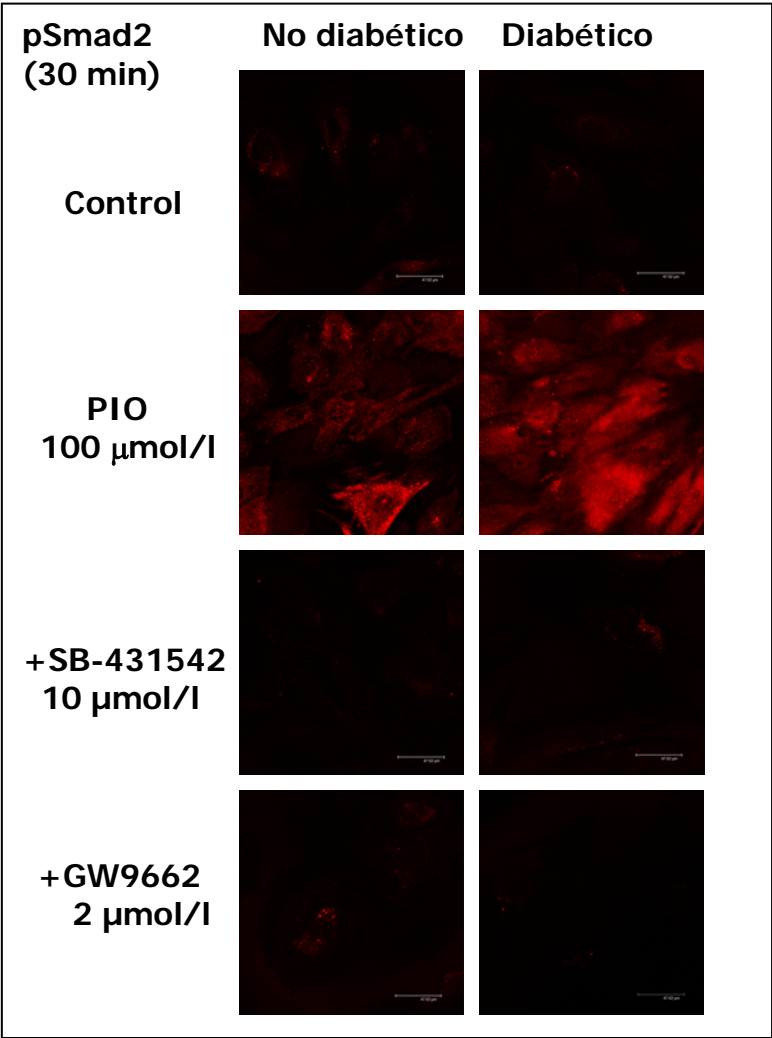


Figura 39: Localización de pSmad2 en presencia de pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$) y efecto de los inhibidores de ALK-4/5/7 SB-431542 (10 $\mu\text{mol/l}$), o de PPAR- γ GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$). Experimentos realizados en medio con 15 mmol/l de glucosa, siguiendo la técnica de microscopía confocal.

2.5.1. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización citosólica de pSmad2 en pacientes no diabéticos

Con el objetivo de dilucidar la importancia de esta vía, se comparó la intensidad citosólica de las VSMC de pacientes no diabéticos tratadas con pioglitazona 100 $\mu\text{mol/l}$ (30 min) en presencia o ausencia de los inhibidores de ALK-4/5/7 SB-431542 (10 $\mu\text{mol/l}$), o de PPAR- γ GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$). El análisis de los resultados obtenidos muestra una reversión de la intensidad citosólica estadísticamente significativa en el caso de ambos inhibidores (Figura 40).

Las moléculas SB-431542 (10 $\mu\text{mol/l}$) y GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$), inhibidores respectivamente de la ALK-4/5/7 y del PPAR- γ , son capaces de revertir los efectos estimuladores de la tinción de pSmad2 por la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$).

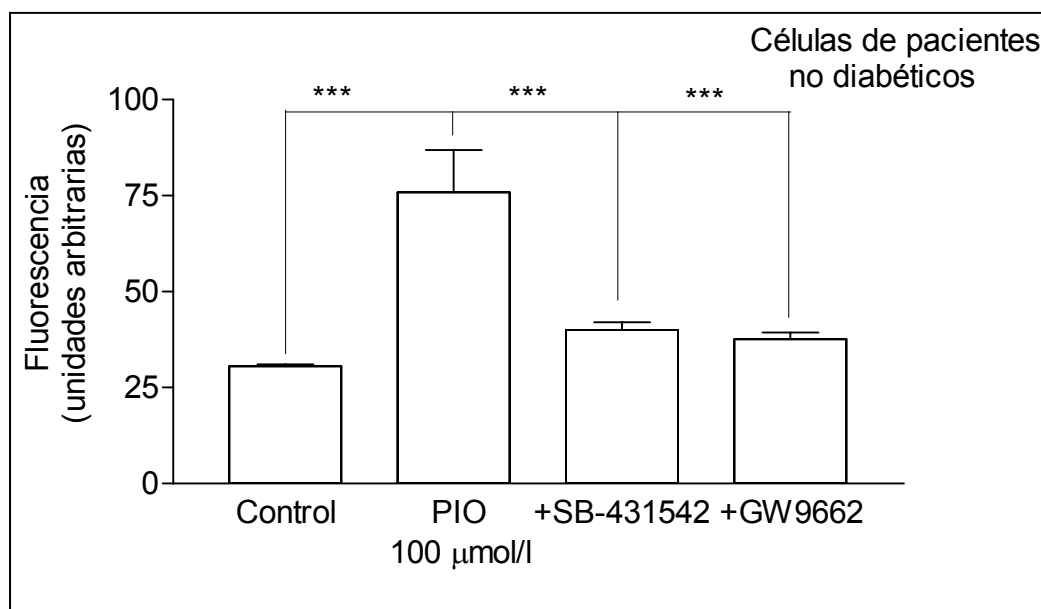


Figura 40: Efecto de los inhibidores de ALK-4/5/7 y del PPAR- γ en la localización citosólica de pSmad2.

*** $p < 0.001$

2.5.2. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización citosólica de pSmad2 en pacientes diabéticos

El análisis de las intensidades de fluorescencia obtenidas con VSMC de pacientes diabéticos presenta unos resultados análogos, que se muestran en la Figura 41. Ambos inhibidores son capaces de bloquear el efecto de la pioglitazona en estas condiciones de cultivo (30 min, medio 15 mmol/l de glucosa).

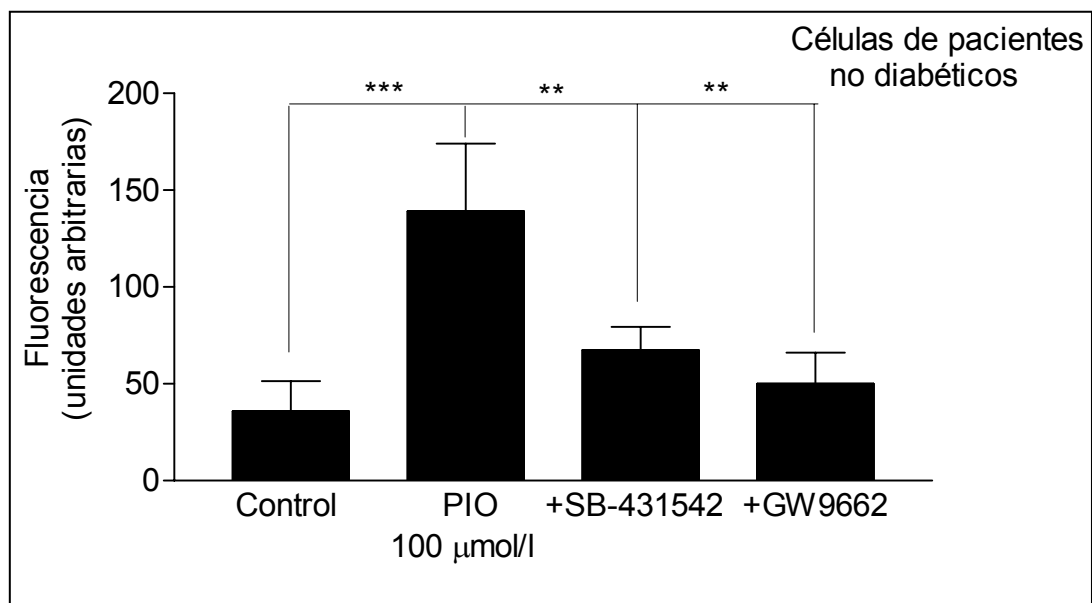


Figura 41: Importancia de las vías de ALK-4/5/7 y del PPAR- γ en el efecto de pioglitazona (100 μ mol/l, en medio con glucosa 15 mmol/l)

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2.5.3. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización nuclear de pSmad2 en pacientes no diabéticos

En el análisis de la fracción nuclear de pSmad2 en pacientes no diabéticos, se observa también un efecto significativo de ambos inhibidores: tanto el SB-431542 (10 $\mu\text{mol/l}$), como el GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$) son capaces de revertir los efectos estimuladores de la internalización nuclear de pSmad2 por la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$), demostrando la importancia respectiva de la ALK-4/5/7 y del PPAR- γ en este efecto farmacológico (Figura 42).

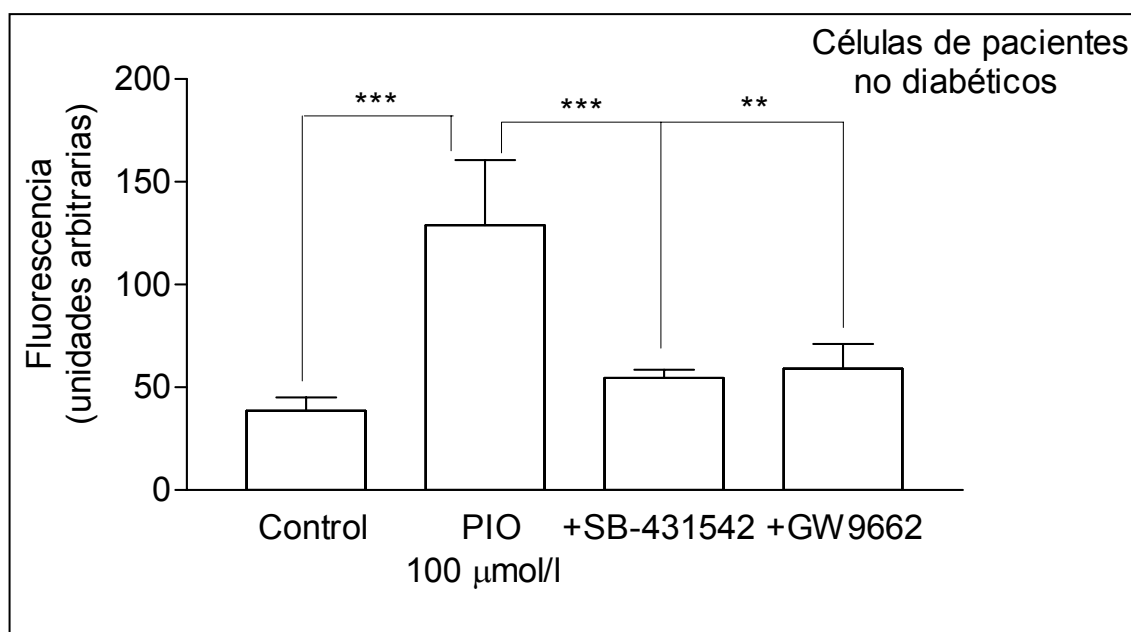


Figura 42: Efecto inhibitorio de las moléculas SB-431542 (10 $\mu\text{mol/l}$) y GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$) en la internalización nuclear de pSmad2 inducida por la pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2.5.3. Análisis cuantitativo del PPAR- γ y ALK-4/5/7 en los efectos de la pioglitazona sobre la localización nuclear de pSmad2 en pacientes diabéticos

El papel crucial de la ALK-4/5/7 y del PPAR- γ en el efecto de reclutamiento nuclear de pSmad2 inducido por pioglitazona (100 $\mu\text{mol/l}$) se aprecia en la Figura 43.

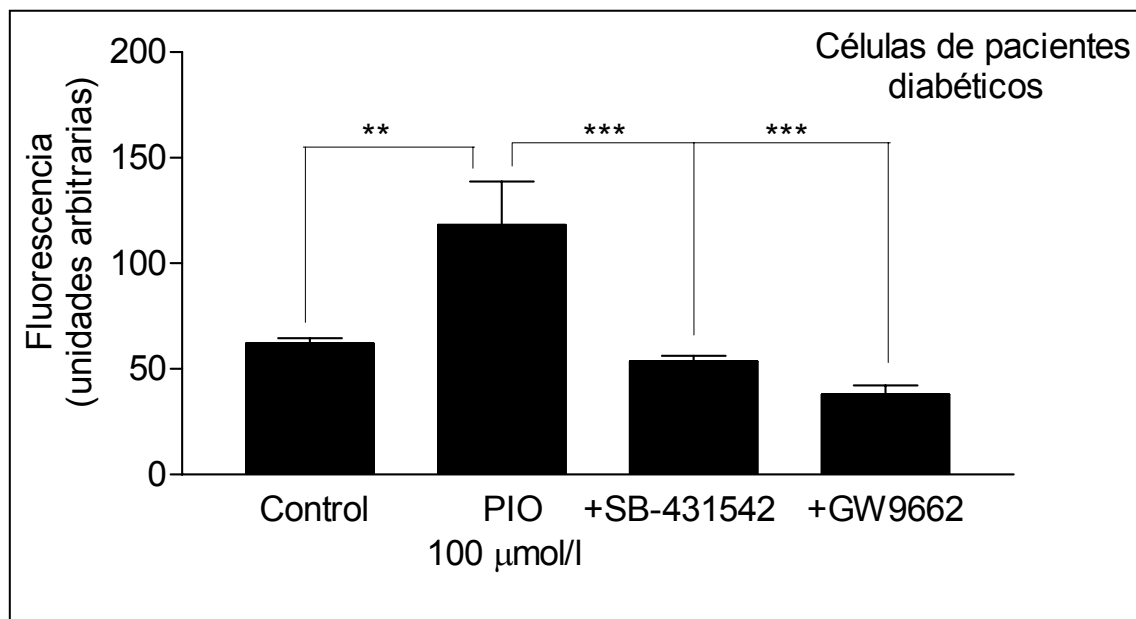


Figura 43: Análisis de la intensidad de la fluorescencia de la fracción nuclear de pSmad2 en material de pacientes diabéticos. Ambos inhibidores bloquean el efecto farmacológico de forma estadísticamente significativa.

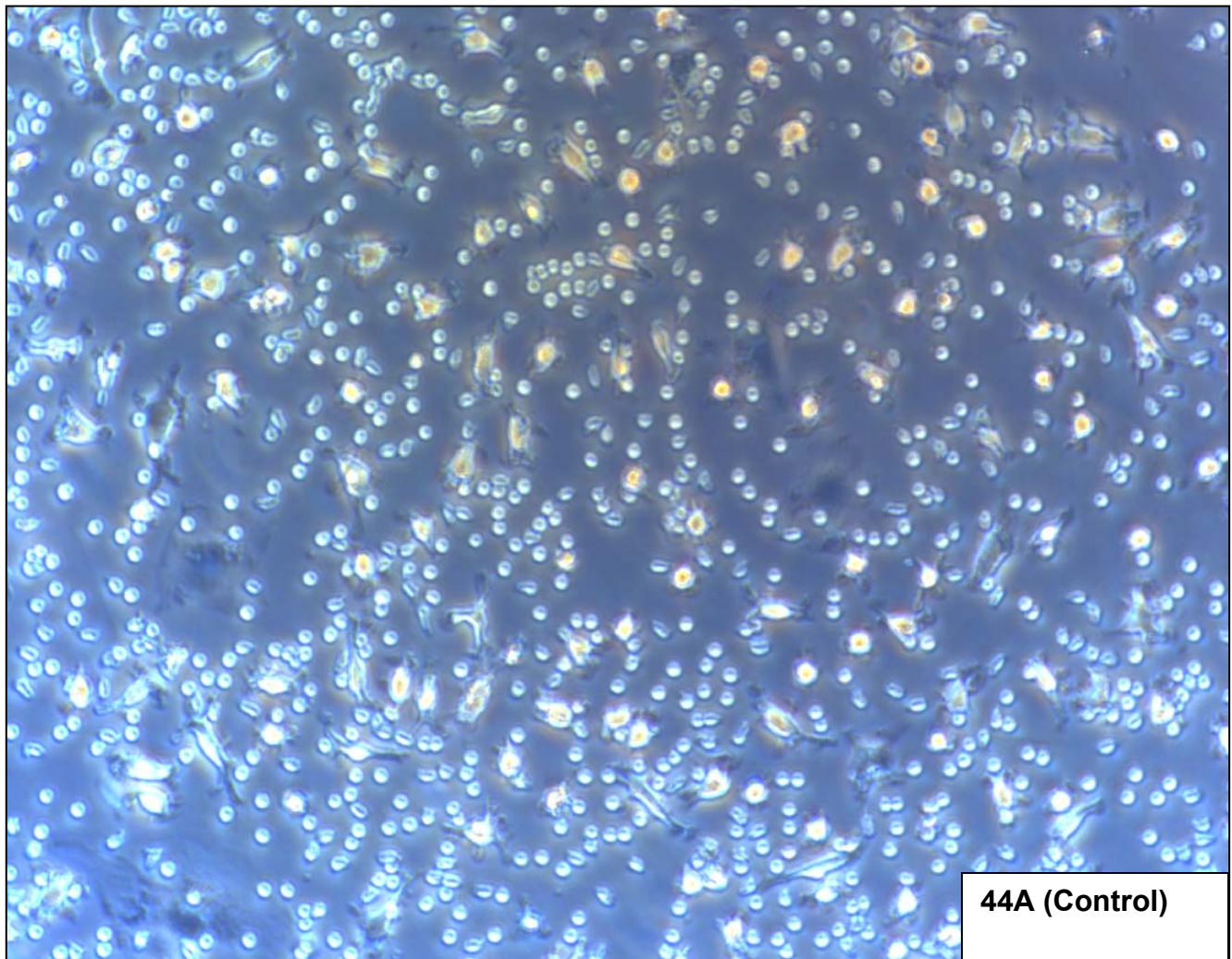
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3. EFECTOS SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES DE DONANTES

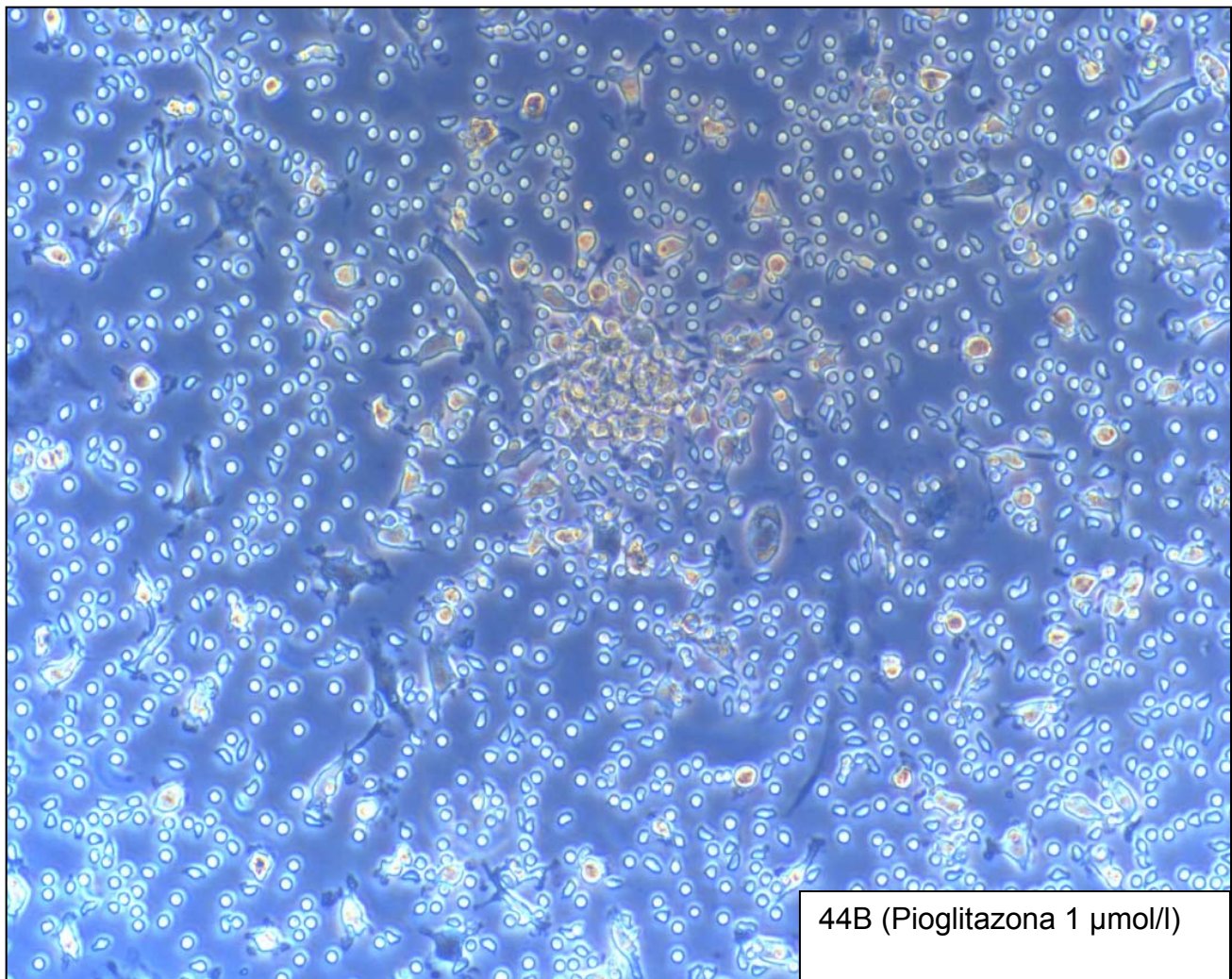
3.1. Efectos descriptivos de la pioglitazona sobre cultivos de EPCs

3.1.1. Efectos morfológicos

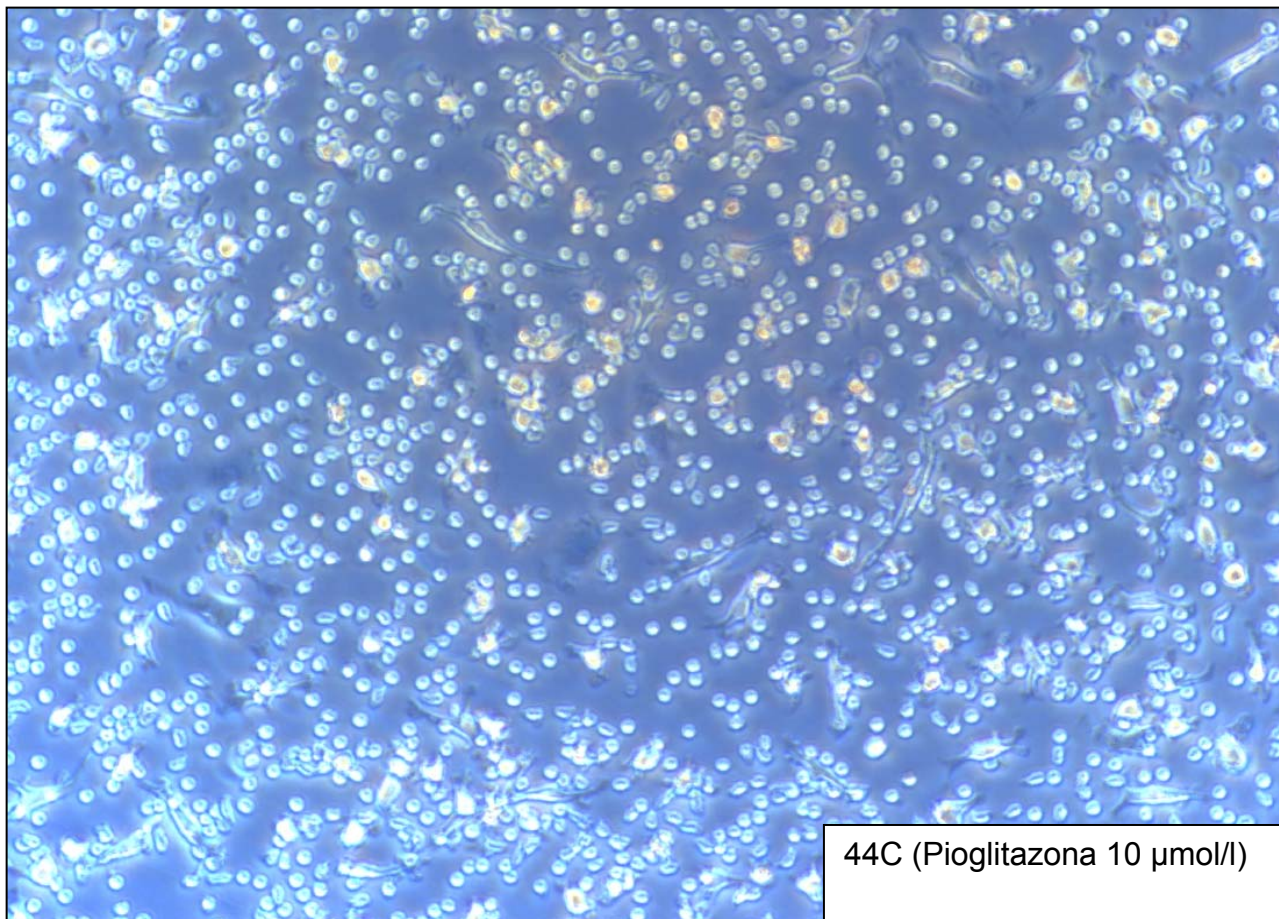
Dado que se ha descrito un efecto estimulador de los agonistas de PPAR- γ a dosis bajas sobre EPCs en cultivo, tratamos de analizar los efectos de la pioglitazona en este medio celular, trabajando con dosis de pioglitazona de 1 y 10 $\mu\text{mol/l}$. Como se aprecia en la Figura 44, se observó un efecto farmacológico bifásico. Respecto al control (Figura 44A), la adición de pioglitazona a 1 $\mu\text{mol/l}$ hizo a las EPCs adquirir una morfología más fusiforme, epitelioides y más proclive a la formación de colonias (Figura 44B). Este efecto no se observa al incubar el cultivo con una concentración de pioglitazona a 10 $\mu\text{mol/l}$ (Figura 44C).



Se aprecia, en la microfotografía, la existencia de células adheridas a la placa de cultivo y un aspecto redondeado, epitelióide o fusiforme. Puede observarse la existencia de células más pequeñas y redondeadas, consideradas como células alimentadoras, encargadas de mantener una adecuada función del cultivo mediante la secreción de citoquinas y la expresión en membrana de moléculas señalizadoras por contacto.



Al tratar el cultivo con pioglitazona a una concentración de 1 $\mu\text{mol/l}$, se observa una mayor definición en las células de la placa, imagen que puede estar mediada por una adhesión aumentada en respuesta al fármaco. También se observa una mayor proporción de células que adquieren una morfología fusiforme, con aumento de sus prolongaciones. Cerca del centro de la imagen, encontramos una unidad formadora de colonias (CFUs) representativa, definida como un agregado de células redondeadas en el centro, rodeado de una periferia de células fusiformes.



Al incubar el cultivo celular con pioglitazona a 10 $\mu\text{mol/l}$ (la concentración más alta usada en EPCs), la morfología recuerda al grupo sin tratar: aumenta la proporción de células redondeadas, se observa un menor número de células fusiformes y disminuye el número de colonias (CFUs), que se observó con anterioridad.

Figura 44 (páginas 153, 154 y 155): Efectos de la pioglitazona (72 h de incubación) sobre la morfología de las EPCs en cultivo a los 7 días de extracción de la sangre. Microfotografía de células vivas, tomada con microscopio invertido y filtro azul. Véase la leyenda que aparece junto a cada microfotografía.

3.1.2. Efecto de la pioglitazona en el número total de células en cultivo

A las 72 h de incubación con pioglitazona y 7 días tras la extracción de la sangre, se procedió a la tripsinización y conteo de las células, utilizando para ello una cámara de Neubauer. Los resultados (Figura 45) muestran una repetición del efecto bifásico en lo que a este parámetro se refiere, alcanzándose un aumento significativo con la concentración de pioglitazona a 1 $\mu\text{mol/l}$, efecto que no se vuelve a observar al aumentar la concentración de pioglitazona a 10 $\mu\text{mol/l}$.

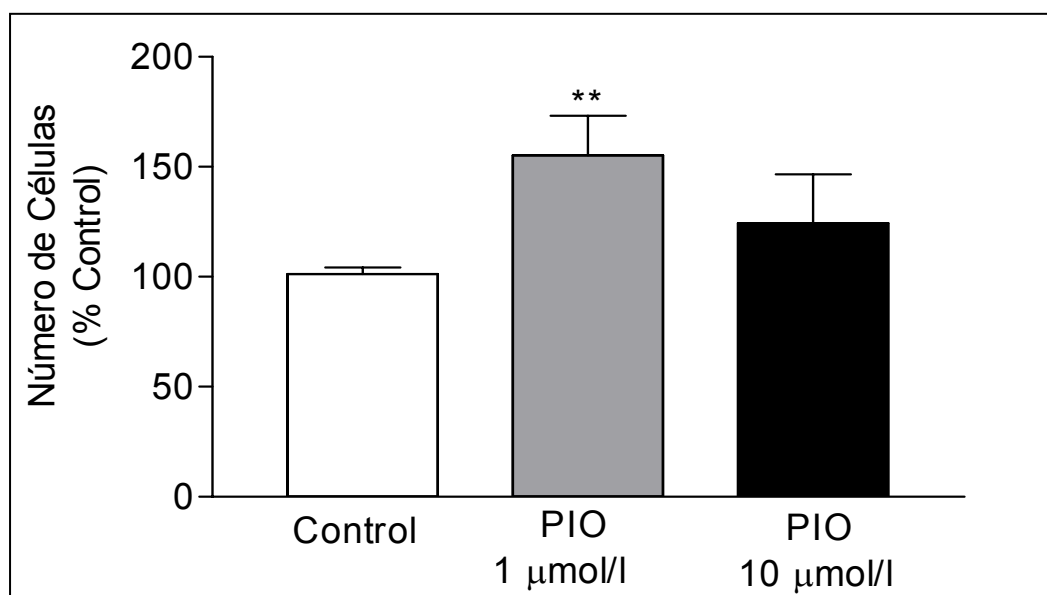


Figura 45: La pioglitazona aumenta el número de total de células, cuando el cultivo de EPCs se somete a una incubación con el fármaco durante 72 h. Este efecto es bifásico, produciéndose de forma significativa con la concentración menor, de 1 $\mu\text{mol/l}$, y no repitiéndose al aumentarse la dosis del fármaco a 10 $\mu\text{mol/l}$.

** $p < 0.01$

3.1.3. Efectos en el número de unidades formadoras de colonias (CFU)

La incubación con pioglitazona (1 $\mu\text{mol/l}$), aumentó el número de CFU en el cultivo de EPCs en el día 7, con respecto al control. De nuevo se observa un efecto bifásico, dejando de observarse un efecto estadísticamente significativo en el número de CFU cuando la dosis se aumenta a 10 $\mu\text{mol/l}$ (Figura 46).

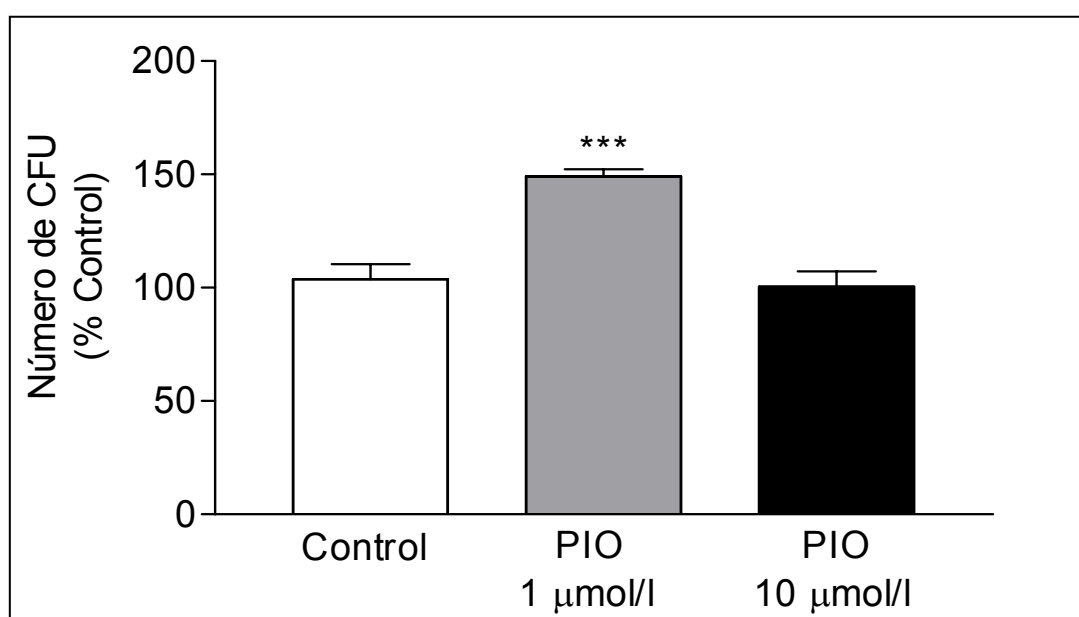


Figura 46: Efecto bifásico de la pioglitazona sobre el número de CFU en cultivos de EPCs, expresado respecto al control. El conteo fue realizado el día 7 tras el aislamiento a partir de la sangre.

*** $p < 0.001$

3.1.4. Correlación entre número de células y número de CFU

El número de CFU se ha relacionado con una adecuada proliferación, migración y adhesión de las EPCs en cultivo (Ingram et al., 2005), que se corresponde además con una mejor función endotelial en pacientes (Hill et al., 2003).

Con objeto de comparar los efectos de la pioglitazona en el número de CFU respecto al número de células obtenidas por contaje, midiéndose ambos parámetros a las 72 h, procedimos a la comparación de ambos resultados mediante la correlación estadística de Pearson. Como se aprecia en la Figura 47, ambos parámetros presentan un elevado coeficiente de correlación.

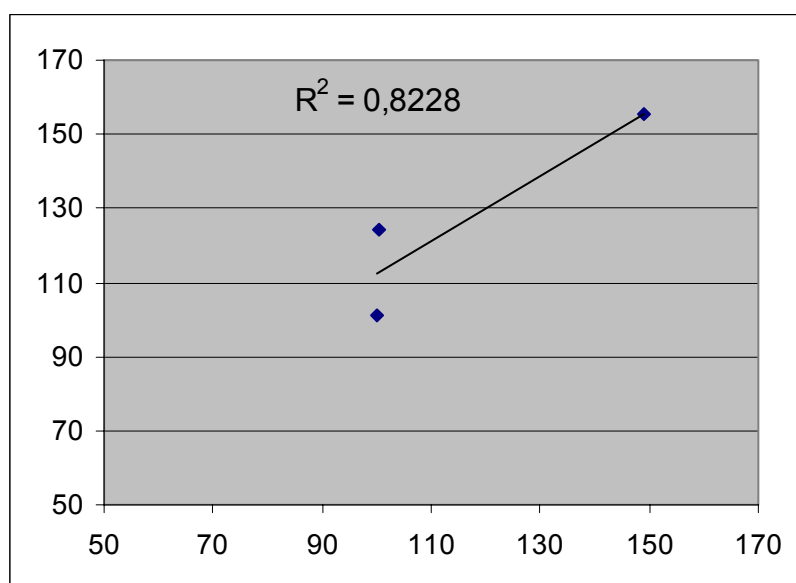


Figura 47: Correlación entre los efectos de la pioglitazona (1 y 10 $\mu\text{mol/l}$) respecto al número de células y formación de CFU en un cultivo de EPCs, tras 72 h de incubación.

3.2. Efectos de la pioglitazona en la caracterización de las EPCs

3.2.1. Expresión de Dil-Ac-LDL/Lectina

Procedimos a analizar, por citometría de flujo, la incorporación del receptor acetilado de LDL (Dil-Ac-LDL), y lectina, tomando las células con doble positividad para esos marcadores como células con caracterización compatible con EPCs.

La Figura 48 muestra un aumento en la población total de células doblemente positivas para Dil-Ac-LDL/Lectina en respuesta a la pioglitazona a 1 $\mu\text{mol/l}$ (72 h), debido fundamentalmente al efecto del fármaco sobre el número total de células y sin afectar de forma dramática a la proporción de las mismas (Figura 49). La concentración de pioglitazona a 10 $\mu\text{mol/l}$ no presenta un efecto significativo, repitiéndose el efecto bifásico aparecido al analizar otros parámetros.

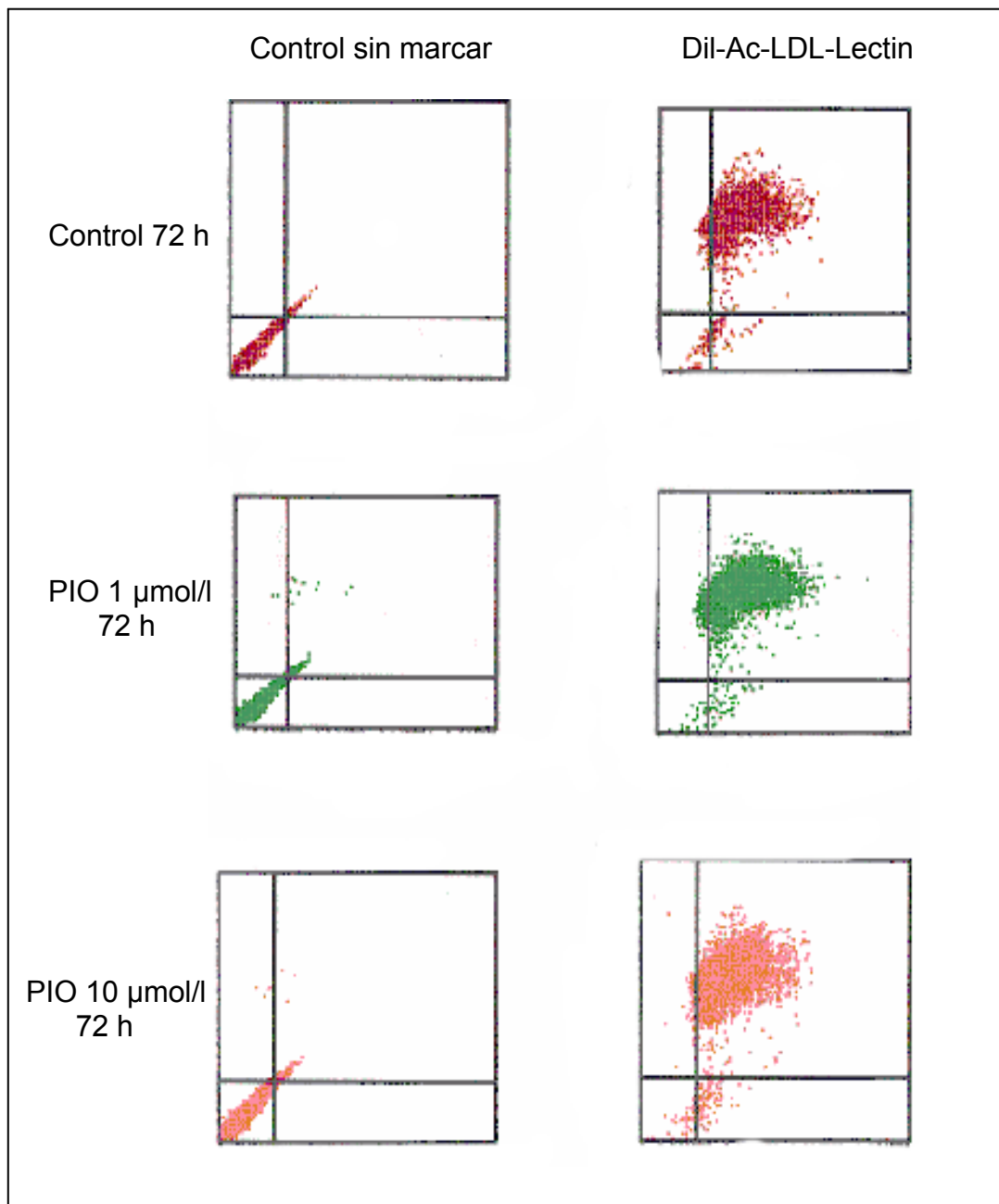


Figura 48: Análisis representativos de la expresión de Dil-Ac-LDL/Lectina en la población celular analizada. Las representaciones de la izquierda son los controles no marcados de referencia; a la derecha se representan los grupos teñidos. De arriba abajo, se sitúan los análisis de citometría de flujo, tras de 72 h de incubación, del grupo control (granate), pioglitazona 1 µmol/l (verde) y pioglitazona 10 µmol/l (rosa).

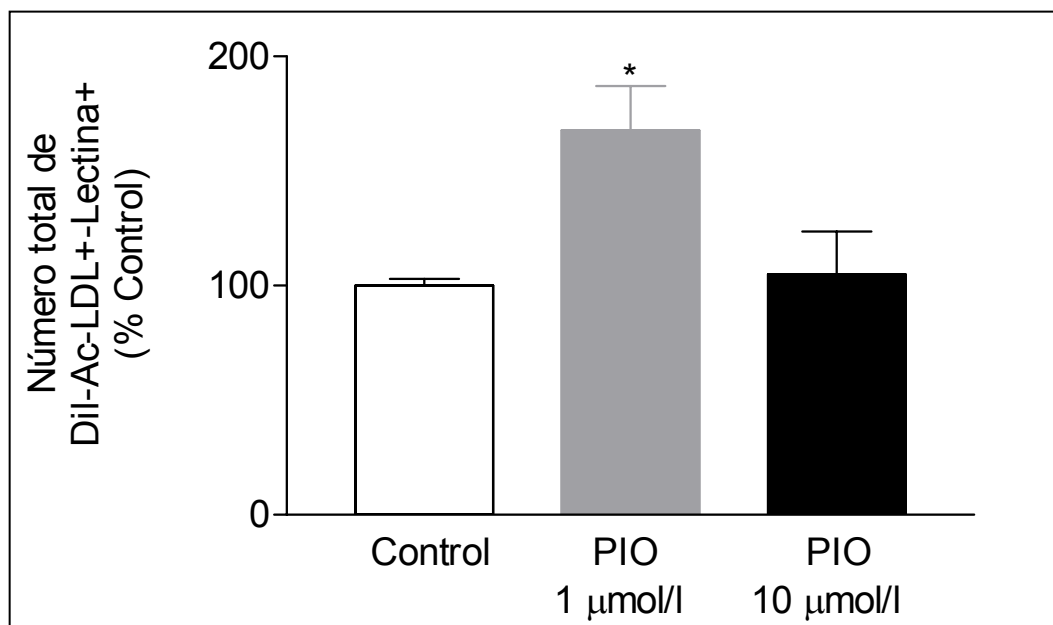


Figura 49: Efecto de la pioglitazona (72 h) sobre el número total de células positivas para Dil-Ac-LDL/Lectina.

** $p < 0.01$

3.2.2. *Expresión de CD31*

Un marcador adicional de linaje endotelial que fue utilizado para el presente estudio fue el CD31. La proporción de población celular doblemente positiva para este marcador no parece afectarse (Figura 50). La Figura 51 muestra un aumento en la población total de células doblemente positivas para CD31 en respuesta a la pioglitazona a 1 $\mu\text{mol/l}$ (72 h), debido fundamentalmente al efecto del fármaco sobre el número total de células. En este marcador, el efecto bifásico se presenta de una forma más acusada, dado que la concentración mayor del fármaco es capaz de disminuir de forma significativa el número total de células positivas para CD31.

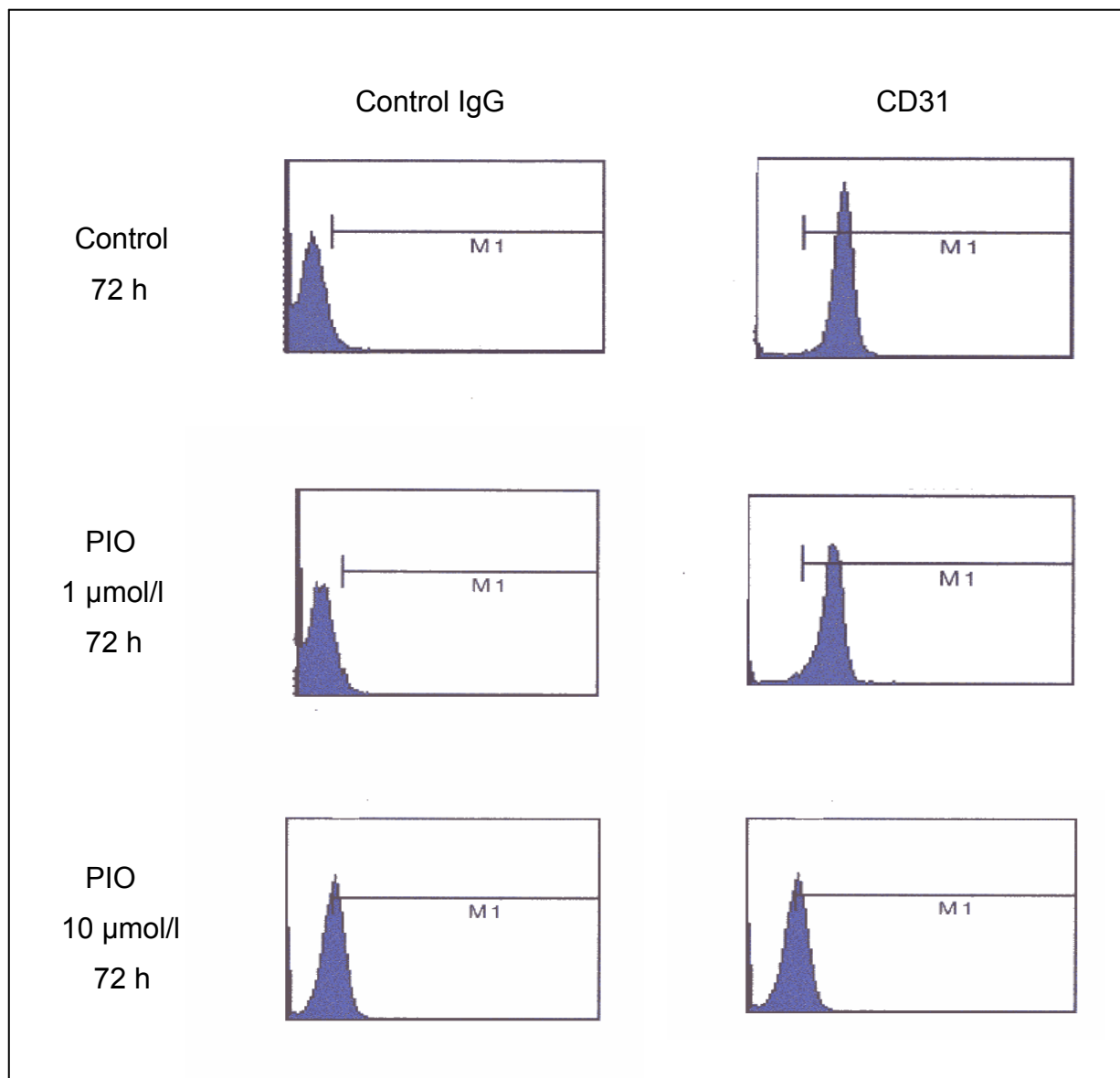


Figura 50: Análisis representativos de la expresión de CD31 en la población celular en estudio. Las representaciones de la izquierda son los controles no marcados de referencia. A la derecha se sitúan los grupos teñidos; de arriba abajo, se sitúan los análisis de citometría de flujo del grupo control, pioglitazona 1 µmol/l y pioglitazona 10 µmol/l.

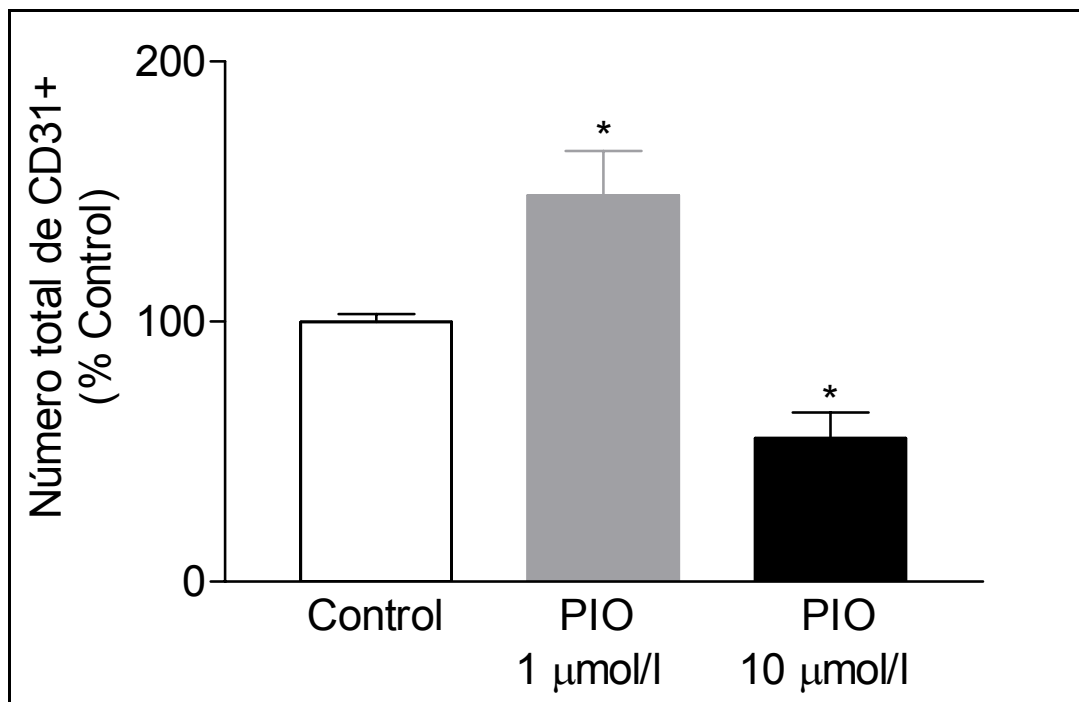


Figura 51: Efecto de la pioglitazona (72 h) sobre el número total de células positivas para CD31.

* $p < 0.05$

3.2.3. *Expresión de KDR*

El receptor KDR (receptor con dominio kinasa inserto), es una isoforma del receptor de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial). La proporción de células positivas para este receptor puede considerarse un marcaje restrictivo, pero muy específico, de linaje propio de las EPCs. La forma de la separación de las poblaciones (Figura 52) muestra cambios ya en la proporción de células situadas en una u otra clasificación (positiva o negativa para KDR). El número total de células positivas es ya bajo en el control. Sin embargo, 72 h de incubación con pioglitazona a 1 $\mu\text{mol/l}$ lo elevan poderosamente, viéndose fuertemente disminuido en el grupo tratado con pioglitazona 10 $\mu\text{mol/l}$ (Figura 53).

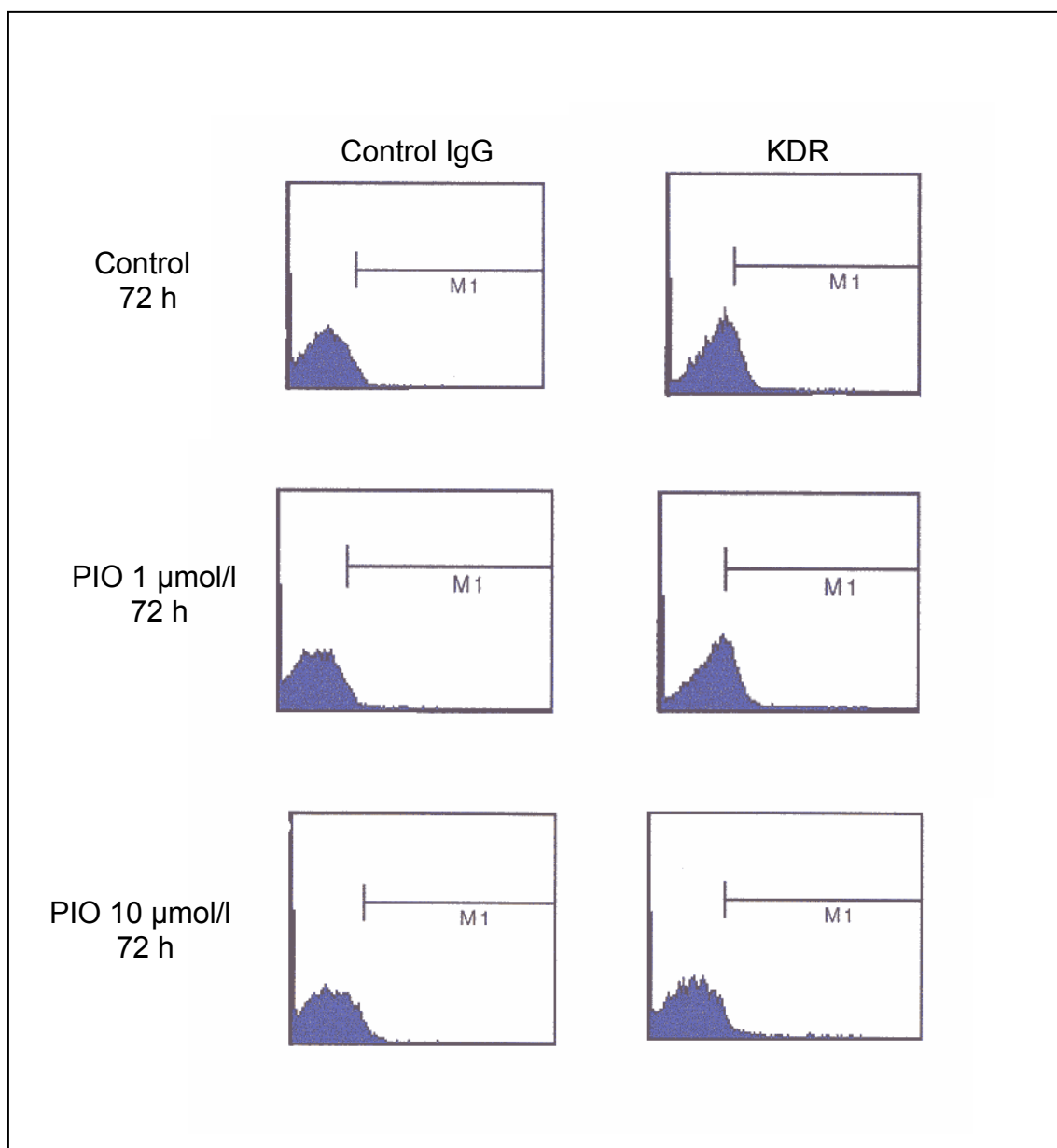


Figura 52: Análisis representativos de la expresión de KDR en la población celular en estudio. Las representaciones de la izquierda son los controles no marcados de referencia; a la derecha se localizan los grupos teñidos. De arriba abajo, se sitúan los análisis de citometría de flujo del grupo control, pioglitazona 1 µmol/l y pioglitazona 10 µmol/l.

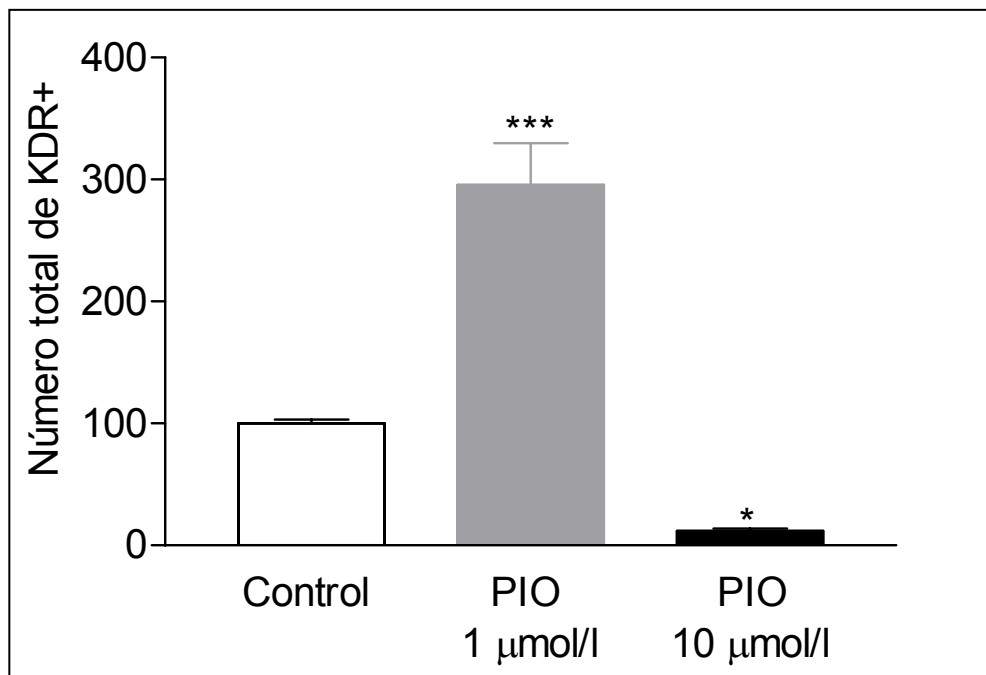


Figura 53: Análisis del número total de células positivas para KDR tras 72 h de incubación en medio en presencia o ausencia de pioglitazona (1 o 10 µmol/l).

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

3.2.4. Expresión de CD105 (endogлина)

El CD105 (endogлина) es un receptor accesorio del TGF- β 1 que se expresa en la membrana de células circulantes y puede relacionarse con la intensidad de la señal del TGF- β 1, un efecto determinante para la diferenciación vascular. El análisis del número global de células positivas para CD105 muestra un aumento, esta vez concentración-dependiente (Figura 54). De este modo, al realizarse el análisis de número total de células CD105 positivas, encontramos que su número es significativamente mayor en la concentración mayor de pioglitazona (10 μ mol/l), como se aprecia en la Figura 55.

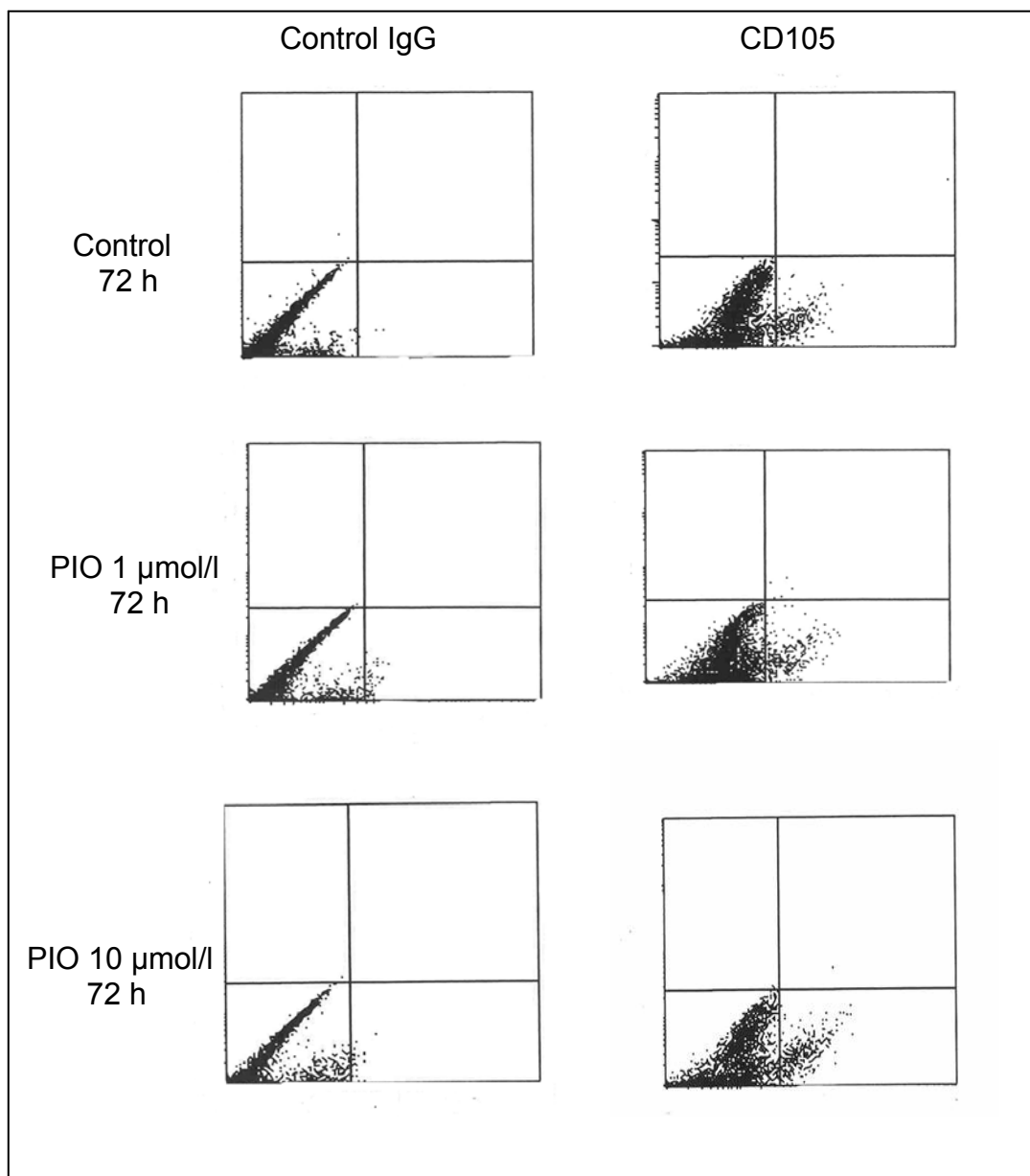


Figura 54: Análisis representativos de la expresión de CD105 en la población celular analizada. Las representaciones de la izquierda son los controles no marcados de referencia; a la derecha se localizan los grupos teñidos. De arriba a la izquierda, y de arriba abajo, se sitúan los análisis de citometría de flujo del grupo control, pioglitazona 1 µmol/l y pioglitazona 10 µmol/l (72 h).

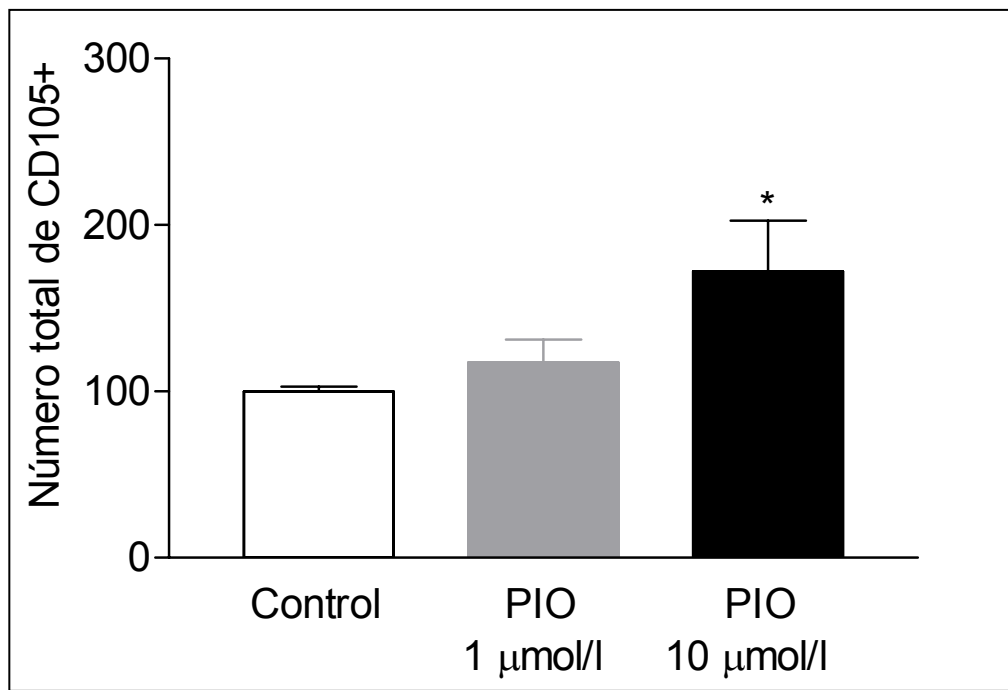


Figura 55: Efecto de la pioglitazona (72 h) sobre el número total de células positivas para CD105.

** $p < 0.01$

3.3. Proliferación celular

Con el objetivo de medir la proliferación celular en las condiciones estudiadas, procedimos a realizar una serie de experimentos en los que se utilizó el ensayo CyQuant®, capaz de medir la concentración de ácidos nucleicos mediante fluorimetría. Los resultados obtenidos muestran que, en las condiciones estudiadas, ninguna de las concentraciones utilizadas de pioglitazona realiza un efecto significativo en este parámetro (Figura 56).

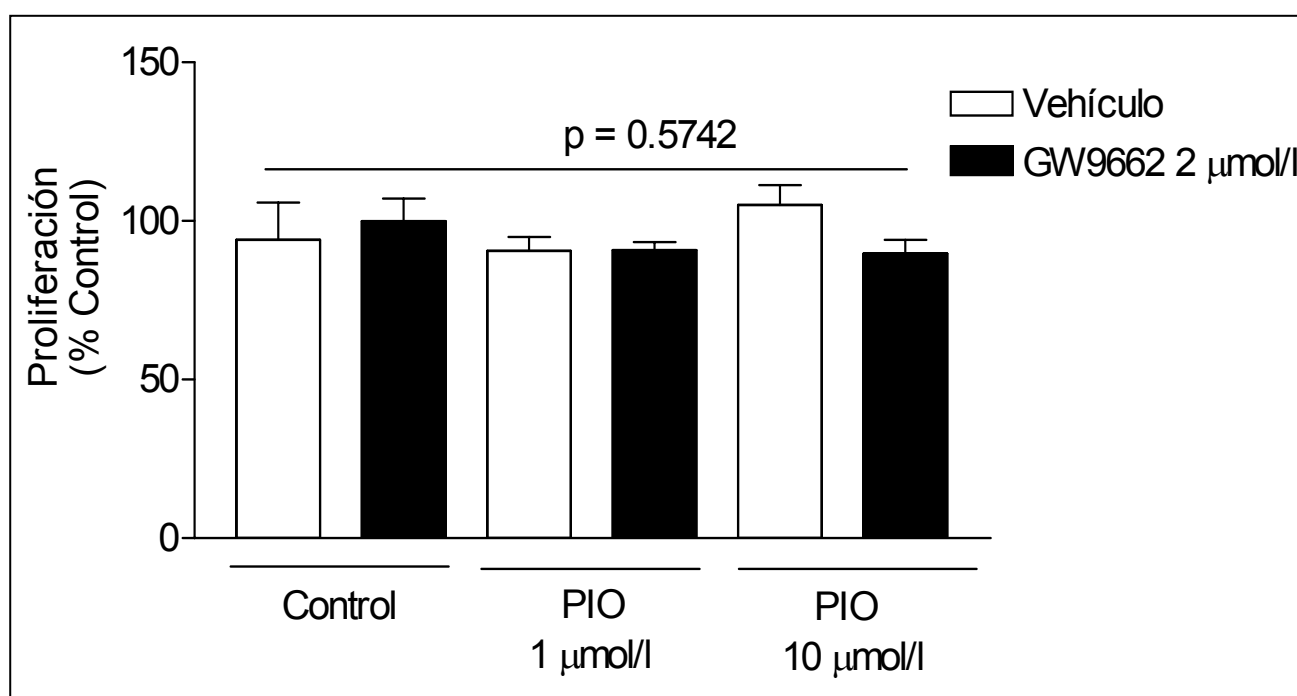


Figura 56: Efectos de la pioglitazona en la proliferación del cultivo de EPCs (medido como concentración de ácidos nucleicos por fluorimetría, tras 72 h de incubación). Ni la pioglitazona (1 o 10 µmol/l) ni el antagonista de PPAR- γ GW9662 (2 µmol/l) presentan efectos significativos.

3.4. Adhesión celular

Este parámetro se midió utilizando una cámara de flujo, en la que posteriormente se contaba el número de células adheridas a una placa de fibronectina, tras 72 h de incubación con el fármaco o el control. En este grupo de resultados (Figura 57) volvió a observarse el efecto bifásico que se ha observado también en otros parámetros. La adhesión se encuentra aumentada tras la incubación en pioglitazona a 1 $\mu\text{mol/l}$, y este parámetro no se ve alterado de forma significativa al usar la concentración de 10 $\mu\text{mol/l}$. Resulta interesante comprobar que el efecto, en el caso de la concentración de 1 $\mu\text{mol/l}$, se inhibe con el antagonista de PPAR- γ GW9662 (2 $\mu\text{mol/l}$).

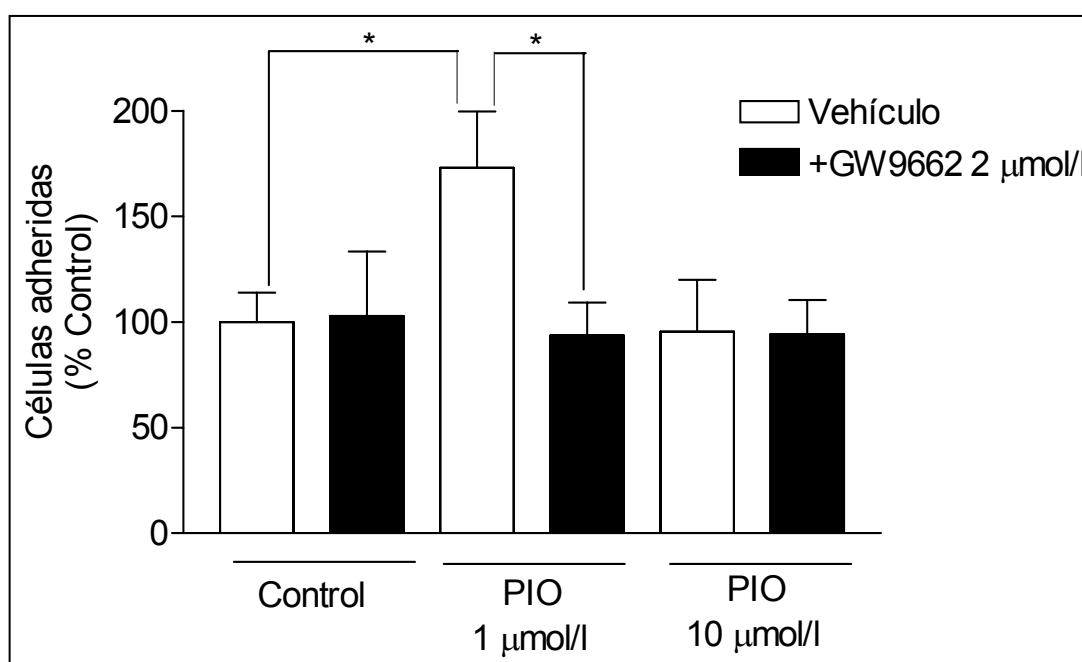


Figura 57: Análisis de adhesión de una suspensión del cultivo de EPCs sobre fibronectina, bajo condiciones de flujo y 72 h de incubación.

* $p < 0.05$

3.5. Secreción de TGF- β 1

Con objeto de comprobar si el TGF- β 1 estaba implicado en el efecto bifásico de la pioglitazona sobre las EPCs, procedimos a medir la secreción de TGF- β 1 de un cultivo de EPCs en respuesta a la pioglitazona. La medición se realizó mediante la técnica del ELISA de medio condicionado.

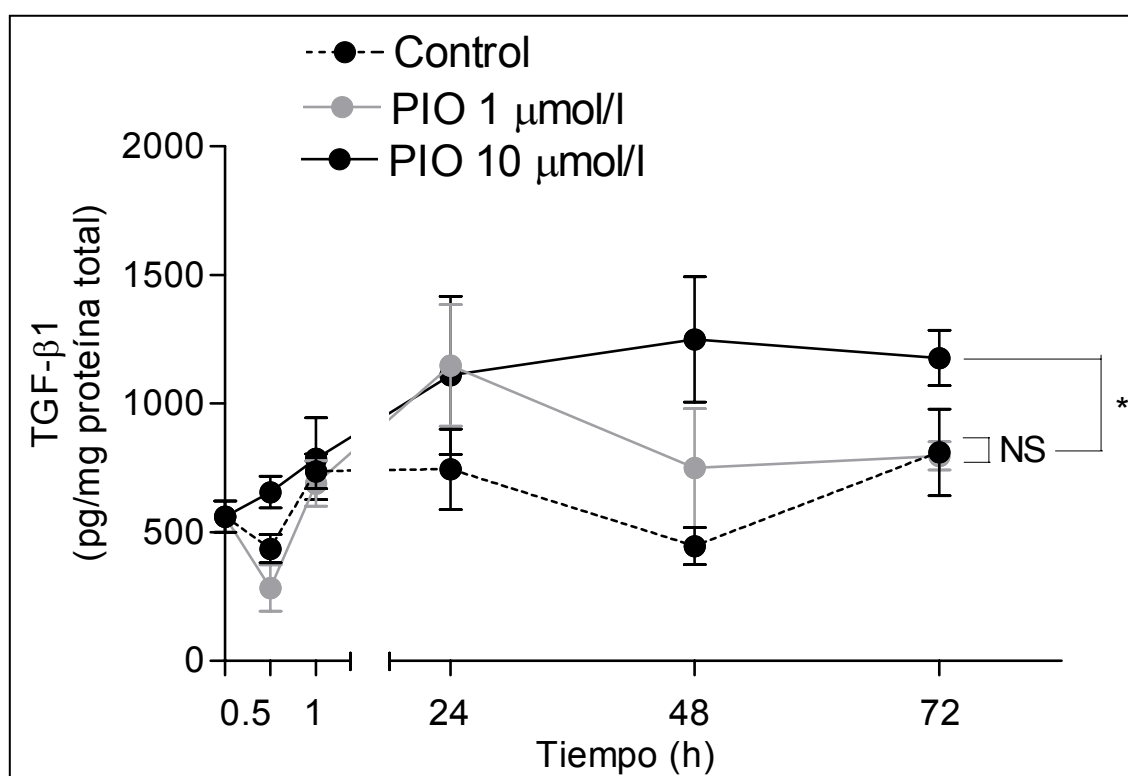


Figura 58: Análisis del efecto de la pioglitazona en la secreción de TGF- β 1 en un cultivo de EPCs. Se observa un aumento inducido por la pioglitazona, a la concentración más elevada (10 μ mol/l), en condiciones de incubación prolongada (24, 48, 72 h). El análisis se realizó por ANOVA de dos vías.

* $p < 0.05$

3.6. Dependencia de TGF- β 1 en el efecto bifásico de adhesión inducido por la pioglitazona

Al producirse un aumento de la secreción de TGF- β 1 en respuesta a 10 μ mol/l de pioglitazona, se trató de comprobar si esta citoquina podría mediar la falta de aumento de adhesión observada al incubar el cultivo de EPCs con esa concentración del fármaco. Para ello, el cultivo se co-incubó con un anticuerpo bloqueante anti-TGF- β 1 (50 μ g/ml):

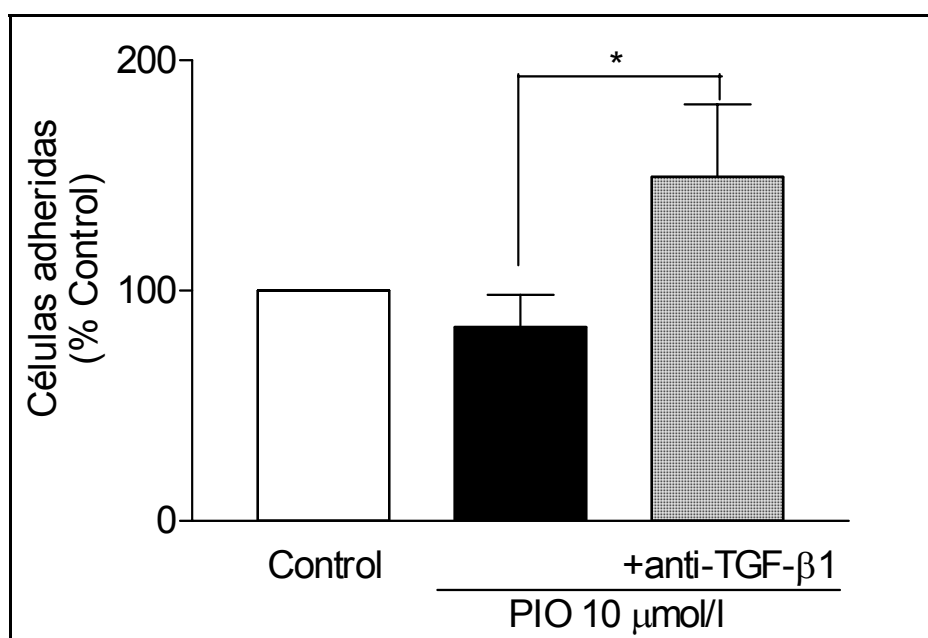


Figura 59: Efecto del anticuerpo anti-TGF- β 1 sobre la adhesión mediada por pioglitazona. El anticuerpo es capaz de revertir la falta de adhesión de EPCs mediada por pioglitazona a 10 μ mol/l.

* $p < 0.05$

DISCUSIÓN

1. RESUMEN DE RESULTADOS ALCANZADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre diversos modelos celulares vasculares permiten ampliar nuestros conocimientos en los mecanismos que modulan la acción celular del fármaco antidiabético pioglitazona. Del mismo modo, permiten comprender los mecanismos de acción que están implicados en los efectos farmacológicos descritos, a la vez que se profundiza en el concepto de la pioglitazona como fármaco con efectos vasculares directos.

También estos resultados suponen un avance en el conocimiento de la regulación farmacológica de la compleja vía del TGF- β 1, esencial, como vimos en la Introducción, en la enfermedad cardiovascular y en otros desórdenes, como muchos tipos de cáncer (Siegel y Massagué, 2003), o enfermedades del sistema inmunológico (Lin et al., 2005). Comentaremos uno a uno todos estos puntos en el presente apartado.

2. EFECTOS SOBRE VSMC DE RATA Y HUMANO: DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN A LA APOPTOSIS. POSIBLE PAPEL DEL TGF- β COMO FACTOR PROTECTOR

En VSMC, tanto de rata como de pacientes diabéticos y no diabéticos, hemos descrito los efectos proapoptóticos de la pioglitazona. Es importante reflexionar sobre las implicaciones que esto puede tener *in vivo* y en la clínica. Esto nos lleva a considerar el efecto general de la apoptosis en la enfermedad cardiovascular, especialmente en la aterosclerosis. ¿Es la apoptosis beneficiosa o perniciosa? La respuesta a esta pregunta no es simple, y está sujeta a constante estudio y controversia (Kockx y Herman, 2000). Se ha demostrado que la apoptosis es un eficaz mecanismo de regulación del crecimiento neto de un tejido (Geng y Libby, 2002). En particular, se ha demostrado que el número de células en las paredes de los vasos sanguíneos parece estar de este modo regulado por un ajustado balance entre la proliferación y la apoptosis (Geng y Libby, 2002).

En muchos casos, la apoptosis de las VSMC puede contemplarse como un mecanismo de debilitamiento de la placa de ateroma, lo que como hemos visto puede originar su ruptura, el establecimiento de una trombosis y el advenimiento de síndromes coronarios agudos.

De manera congruente con este enfoque, se han descrito los efectos antiapoptóticos de ciertos fármacos usados de manera rutinaria en la terapéutica clínica cardiovascular. Un ejemplo son los efectos protectores, en VSMC, de los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II frente a los efectos vasculotóxicos de este péptido (Redondo et al., 2007), o de los polifenoles frente a la apoptosis de VSMC originada por diversos estímulos, como los productos derivados de la oxidación del colesterol LDL (Ruiz et al., 2006).

Sin embargo, en la aterosclerosis parece ser muy importante el acúmulo de VSMC en la capa subintimal y en la media, lo que puede llevar a un crecimiento de la placa (Ross, 1999). Esta hiperplasia celular parece estar regulada por mediadores moleculares de activación del ciclo celular, como p27 o p21 (Diez-Juan y Andrés, 2001).

Este fenómeno de acumulación celular, de aumento del cociente proliferación/apoptosis de las VSMC del vaso, con el consiguiente remodelado de la pared vascular, resulta aún más dramático en el caso de la restenosis post-angioplastia, donde las VSMC que crecen hacia la luz forman una neointima que llega a ocluir la luz. El enfoque de contemplar las VSMC neointimales como células cuyo crecimiento debe limitarse, incluso de forma agresiva, se ha visto respaldado por los buenos resultados, en la prevención de la restenosis post-angioplastia, en el uso de endoprótesis vasculares (*stents*). Los modelos de stents más modernos y perfeccionados están recubiertos de una matriz de ácido poliláctico embebida de diversas sustancias, que de forma muy lenta liberan las moléculas con las que se haya embebido dicha matriz. Se

han obtenido buenos resultados clínicos usando para este fin diversas sustancias citostáticas o citotóxicas, como taxanos (Bavry et al., 2005), o fármacos de efecto antiinflamatorio como la rapamicina (Kaneda et al., 2005). Ambos enfoques parecen tener un efecto parecido en la prevención de la oclusión (Mehilli et al., 2006). Se ha llegado incluso al uso de braquiterapia con fármacos emisores de radiación β , con resultados parecidos (Feres et al., 2005).

Sin embargo, es posible que las VSMC de la neoíntima originada en la restenosis post-angioplastia muestren características diferentes a las de la media (Erl et al., 2003). Un hecho importante para determinar esta observación puede ser el origen que una elevada proporción de ellas parece tener en la médula ósea (Zernecke et al., 2005). Las VSMC de la capa muscular podrían llegar a ser más resistentes al fenómeno apoptótico que las que se encuentran en la capa media, debido también a una mayor expresión de moléculas relacionadas con la inflamación como el PPAR- γ (Bishop-Bailey et al., 2002).

En la aterosclerosis también parece tener una importancia capital el acúmulo de VSMC en la capa subintimal, originándose un engrosamiento neointimal sin angioplastia previa. El cociente íntima-media, fácil de medir de forma no invasiva por ecografía es, de acuerdo con este concepto, un emergente marcador de riesgo cardiovascular (Staub et al., 2006). Sin embargo, es también importante constatar que, en la enfermedad vascular diabética, las VSMC también se encuentran aumentadas en la capa media (Ruiz et al., 2006). Por lo tanto, en el crecimiento de la placa de ateroma, en la enfermedad macrovascular del diabético y en la restenosis post-angioplastia, parece tener lugar una elevación del cociente proliferación/apoptosis. De esta manera, la

descripción *in vitro* de los efectos proapoptóticos por parte de la pioglitazona, y sobre todo su presencia selectiva en VSMC de pacientes diabéticos, o de pacientes o de animales no diabéticos pero incubadas con altas concentraciones de glucosa, podría explicar, al menos en parte, los beneficios alcanzados en estudios con pacientes diabéticos sobre el cociente íntima/media, de forma independiente al control de la glucemia (Langenfeld et al., 2005). Resulta interesante comprobar, en este estudio, la disminución de este parámetro en VSMC de pacientes ateroscleróticos no diabéticos cuando eran incubadas en medio hiperglucémico (15 o 25 mmol/l). Un mecanismo molecular importante en esta resistencia a la apoptosis parece ser el aumento en la expresión de Bcl-2, factor antiapoptótico que evita la salida del citocromo C de la mitocondria, y con ello la puesta en marcha de la cascada enzimática que finaliza con el fenómeno de la apoptosis (Ruiz et al., 2006). Este mecanismo, curiosamente, se ha visto también en la resistencia a la apoptosis de células tumorales, especialmente en cánceres hematológicos (Sup et al., 2005).

En cualquier tejido sometido a recambio celular, el crecimiento neto depende de un complejo equilibrio entre la creación de nuevas células por mitosis y la pérdida de otras por apoptosis o muerte celular programada (Geng y Libby, 2002). En la aterosclerosis y restenosis, la acumulación de VSMC podría deberse a un aumento de la proliferación y/o a una disminución de la apoptosis. Si bien en la aterosclerosis puede ser importante un aumento en el índice mitótico de las VSMC (Andrés y, Castro, 2003), puede ser aún más importante el disminuido índice apoptótico que presentan las VSMC en la placa de ateroma. Este enfoque de considerar el defecto de los mecanismos apoptóticos

en la enfermedad cardiovascular permite explicar varios hechos. El más importante es la exacerbación de la enfermedad aterosclerótica en los pacientes diabéticos con acúmulo de VSMC en la capa media, lo que se ha relacionado con una disminución de su capacidad apoptótica, comparada a VSMC de pacientes ateroscleróticos no diabéticos (Ruiz et al., 2006).

Debido a la importancia de la resistencia a la apoptosis en la aterosclerosis, especialmente en la aterosclerosis del diabético, la descripción de efectos apoptóticos sobre VSMC tras el uso de pioglitazona adquiere importancia desde el punto de vista de la terapéutica experimental. El efecto apoptótico de este fármaco ya ha sido descrito sobre VSMC neointimales y sobre VSMC tratadas con citoquinas proinflamatorias (Aizawa et al., 2001). Este efecto *in vitro* se ha relacionado asimismo con los efectos *in vivo* en la inhibición de la restenosis experimental tras lesión con balón en modelos animales experimentales, y en ensayos clínicos (Takagi et al., 2003). Un gran paralelismo con estas ideas se advierte al estudiar los estudios clínicos publicados sobre el efecto de la pioglitazona el índice íntima-media. Tanto un estudio clínico retrospectivo (Koshiyama et al., 2001) como otro estudio aleatorizado y diseñado específicamente con este fin (Langenfeld et al., 2005) han permitido corroborar el efecto de la pioglitazona, en la terapéutica de pacientes, en limitar el crecimiento de las VSMC de los vasos.

Las condiciones en las que nuestros resultados muestran un efecto apoptótico de la pioglitazona merecen ser comentadas. Observamos que el fármaco induce apoptosis en VSMC de ratas normales, no diabéticas, sin suplemento de glucosa, mientras que en humanos este efecto sólo tiene lugar cuando la

concentración de glucosa en el medio de cultivo se ve suplementada hasta alcanzar unos valores finales de 15 o 25 mmol/l, que corresponden a una hiperglucemia clínica, alcanzable en pacientes diabéticos. La respuesta a esta aparente discordancia entre especies (rata o humano) puede estar en las diferencias entre los medios cultivo utilizados en cada caso. Para cultivar VSMC de rata, utilizamos el medio de cultivo DMEM (Gibco, Madrid), que contiene glucosa a 25 mmol/l. Este medio, ciertamente hiperglucémico, es sin embargo el más utilizado en los cultivos de VSMC de rata. Probablemente, el mayor índice mitótico de VSMC de rata con respecto a los cultivos homólogos de arterias humanas se relacione con unos mayores requerimientos energéticos debidos a un mayor índice proliferativo (Kirschelohr et al., 1993). Sin embargo, este hallazgo es una muestra de la conveniencia de corroborar los resultados encontrados en modelos animales de experimentación en modelos procedentes de material humano.

El hallazgo, en VSMC humanas, de una acción apoptótica de la pioglitazona en los casos de hiperglucemia puede sentar las bases de estudios futuros en los que se profundice este hallazgo. Resulta interesante comprobar que esta selectividad dependiente de los niveles de glucosa se corresponde con el hallazgo de unos mayores valores de glucemia en el grupo de pacientes diabéticos de nuestra cohorte, a pesar de un adecuado diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es interesante comprobar el comportamiento parecido, frente a la apoptosis ejercida por la pioglitazona, de las VSMC de pacientes diabéticos y no diabéticos en condiciones de aumento de glucosa. En otro estudio comprobamos que la resistencia a la apoptosis de

VSMC de diabéticos, si bien puede ser reproducida en VSMC de no diabéticos aumentando la concentración de glucosa en el medio, se mantiene en los diabéticos de larga evolución tras semanas de incubación en medio con glucosa normal (Ruiz et al., 2006). De esta manera, si el mecanismo de apoptosis selectiva dependiente de hiperglucemia se diera en pacientes diabéticos y no diabéticos se diera *in vivo* en los pacientes, nos encontraríamos con ciertas ventajas:

- La pioglitazona aumentaría la apoptosis incluso en los diabéticos de larga evolución, donde la apoptosis se ve disminuida. De este modo se comportaría como un fármaco etiológico no sólo en el mecanismo causal de la diabetes tipo 2 (la resistencia a la insulina), sino también en una destacada causa de su peor pronóstico vascular (la resistencia a la apoptosis de sus VSMC). Sería por lo tanto un mecanismo de vencer esa resistencia.
- En sujetos ateroscleróticos no diabéticos, donde parece haber una mejor regulación en los mecanismos fisiológicos que modulan la apoptosis de sus VSMC, la apoptosis inducida por pioglitazona se produciría en picos hiperglucémicos, posibles en enfermos ateroscleróticos aún no diabéticos pero con intolerancia a la insulina. Sin embargo, hay que recordar que este fármaco sólo está aprobado para su uso en pacientes ya diagnosticados de diabetes tipo 2.

- Si este mecanismo descrito tuviera lugar en los pacientes, se podría explicar, al menos por una parte, la existencia, comprobada en estudios clínicos, de beneficios cardiovasculares de la pioglitazona independientemente de su acción hipoglucemiante (Pfutzner et al., 2005). La pioglitazona no se limitaría en ese caso a disminuir la hiperglucemia y evitar daños vasculares debidos a ella, sino que precisamente actuaría mejor en los vasos cuando la glucemia es alta. Queda sin embargo mucho que investigar sobre los mecanismos que modulan la resistencia a la apoptosis inducida por la diabetes y/o hiperglucemia, así como los determinantes que permiten a la pioglitazona el vencer esa resistencia.

Otro mecanismo que podría ser importante *in vivo* para la potenciación y selectividad en el efecto de la pioglitazona sobre tejidos vasculares enfermos, puede ser la dependencia de PPAR- γ que hemos detectado en nuestros resultados en apoptosis VSMC de rata y pacientes no diabéticos y diabéticos. Tradicionalmente consideradas como meros agonistas de PPAR- γ (el fin para el que fueron diseñados), se ha venido describiendo en los últimos años algunos efectos de las tiazolidinodionas que parecen ser independientes de ese receptor nuclear (Seargent et al., 2004). Estos efectos se han descrito sobre todo en la inhibición de la síntesis de DNA en líneas celulares tumorales (Laurora et al., 2003). La existencia de nuevos fármacos agonistas de PPAR- γ no tiazolidinodiónicos permitirá investigar estos efectos en más profundidad, sobre

todo en lo que la dependencia del anillo estructural tiazolidinodiónico se refiere (Bruemmer et al., 2003).

Sin embargo, en VSMC se ha comprobado en diversos modelos animales tanto la dependencia de PPAR- γ en el efecto apoptótico de las tiazolidinodionas a dosis altas (que aquí reproducimos), como la mayor expresión de PPAR- γ en VSMC neointimales (Bishop-Bailey et al., 2002). Si esto ocurriera en pacientes, la pioglitazona podría ser un fármaco vascular selectivo por partida doble: actuaría más en las VSMC de pacientes diabéticos (las más resistentes a la apoptosis) por estar sometidas a hiperglucemia y expresar PPAR- γ en mayor medida (Bishop-Bailey et al., 2002).

Otro hecho destacado, en nuestros resultados en VSMC de rata y humanos, consiste en el hallazgo de una dependencia de PPAR- γ en los efectos de la pioglitazona (100 μ mol/l) sobre la secreción de TGF- β 1 o el reclutamiento nuclear de pSmad2 en tiempos muy cortos (30 min). Estos tiempos no darían un margen suficiente al PPAR- γ para que actuara en su función clásica de factor de transcripción. Sin embargo, hay investigaciones que describen los efectos no genómicos de PPAR- γ , que parece deberse a una población de receptores en la membrana (Takeda et al., 2001).

Los efectos de la pioglitazona sobre VSMC que hemos descrito aquí se relacionan de forma muy estrecha con la vía del TGF- β , que como hemos visto puede considerarse un complejo mediador de la enfermedad cardiovascular y a la vez una prometedora diana para la terapéutica experimental (Redondo et al., 2007). Nuestros resultados apoyan la idea de una relación entre una menor función de TGF- β (Grainger et al., 1995) y menor señalización por las Smads

(Kalinina et al., 2004) con la enfermedad cardiovascular, efectos ampliamente observados y discutidos (Grainger et al., 2004). De manera global, la idea de considerar el TGF- β 1 como una citoquina protectora frente a la enfermedad cardiovascular se basa en los efectos antiproliferativos (McCaffrey et al., 2001), proapoptóticos (Ten Dijke y Hill, 2004), antiinflamatorios (Ikonomidis et al., 1999) e inmunomoduladoras (Hansson y Robertson, 2004) que presenta en modelos animales y en muestras procedentes de pacientes.

En la mayoría de los tipos celulares, y entre ellos las VSMC, el TGF- β 1 actúa a través de un receptor heterotetrámero formado por dos subunidades TGF- β -R-II y dos subunidades TGF- β -R-I (asociados a las kinasas ALK-4/5/7). Las subunidades II son activadas por la unión de TGF- β 1 exógeno y, posteriormente, fosforilan las subunidades I. La fracción kinasa del receptor I de TGF- β fosforila las kinasas relacionadas con la activina, o ALK, las cuales a su vez fosforilan las proteínas Smad2 o Smad3. Al activarse, se unen a la Smad4, siendo transportadas al interior del núcleo celular y regulando la expresión de genes (Shi y Massagué, 2003).

La existencia de bloqueantes específicos tanto del TGF- β (en forma de anticuerpos monoclonales), así como la de inhibidores enzimáticos de la actividad kinasa de la ALK-4/5/7 está permitiendo un rápido avance en el conocimiento de la regulación fisiológica y farmacológica de esta importante vía celular (Inman et al., 2002). Del mismo modo, su efecto terapéutico en el cáncer (sobre todo en la prevención de las metástasis), en enfermedades fibróticas y cardiovasculares es un objeto de estudio en la actualidad (Yingling et al., 2004).

Otra importante línea de investigación en la farmacología del TGF- β se basa en su modulación por fármacos ya utilizados en la terapéutica médica, como la pioglitazona. Este es el enfoque que ha guiado la presente tesis doctoral. Además de considerar al TGF- β 1 como una diana terapéutica útil, modificable por fármacos ya existentes, y por otros nuevos diseñados para tal fin, el estudio de la farmacología del TGF- β 1 puede también suponer una profundización en el conocimiento del papel de esta vía en la enfermedad cardiovascular. La aplicación práctica de estos estudios permitiría usar las concentraciones de esta citoquina en la sangre de pacientes (Ikonomidis et al., 1999) o la señalización del TGF- β 1 en muestras vasculares de pacientes (Kalinina et al., 2004), como herramientas de monitorización, pronóstico y ajuste del tratamiento en la enfermedad cardiovascular.

Una importante línea de investigación para el futuro consistirá en la investigación de posibles diferencias entre la función del TGF- β 1 tanto en la sangre como en los vasos de pacientes diabéticos y no diabéticos, y comprobar si su relación con la diferente capacidad apoptótica de sus VSMC. En los vasos de pacientes ateroscleróticos parece tener lugar una menor señalización de TGF- β (McCaffrey et al., 1995), así como un acúmulo de VSMC (Ruiz et al., 2006). Es por eso interesante comprobar la relación entre los efectos apoptóticos de la pioglitazona con su agonismo sobre la vía del TGF- β 1 y la pSmad2 (Redondo et al., 2005). Estudios en curso en nuestro laboratorio están dedicados a la investigación de posibles diferencias en la biología del TGF- β 1 en la sangre y los vasos de pacientes diabéticos y no diabéticos sometidos a cirugía de revascularización coronaria. De la misma manera, la correlación de

las determinaciones clínicas referidas a esta vía con los tratamientos farmacológicos seguidos por los pacientes permitiría suplir una importante carencia en el conocimiento de la modulación farmacológica del TGF- β 1 por parte de la comunidad científica.

3. EFECTOS SOBRE EPCs: DEL ESTÍMULO A LA INHIBICIÓN. POSIBLE PAPEL DEL TGF- β COMO FACTOR PATOGENICO

Es importante constatar las repercusiones derivadas del TGF- β 1 sobre las EPCs, ya que supondría establecer una relación de ideas entre dos importantes y emergentes mediadores de la enfermedad cardiovascular. Desde la aparición del trabajo seminal de Asahara y co-autores hace casi una década (Asahara et al., 1997), está ganando una creciente aceptación la idea del papel fundamental de las EPCs en la reparación endotelial autógena mediante un mecanismo de vasculogénesis del adulto.

La posibilidad de obtener células vasculares a partir de la sangre supone, como todas las técnicas experimentales que permiten el uso de ese fluido biológico, una ventaja clínica evidente por su amplia accesibilidad. Esta explicación, puramente técnica y logística, podría ser la explicación del rapidísimo desarrollo de la investigación de material humano y del enfoque translacional o de transferencia que se ha producido en el campo de las EPCs (Ingram et al., 2005).

De acuerdo con el paradigma de la vasculogénesis, los factores de riesgo cardiovascular disminuirían la capacidad reparadora de estas EPCs en número y función (Hristov y Weber, 2006), lo que llevaría a la explicación de una relación entre su disminución y el riesgo cardiovascular (Schmidt-Lucke et al., 2005).

Como hemos comentado, en las EPCs el TGF- β 1 puede generar un efecto estimulante a concentraciones bajas. A mayores concentraciones, por el contrario, puede tener un efecto inhibitor (Henrich et al., 2004). Dado que el TGF- β 1 puede estar implicado en el mecanismo de acción de fármacos cardiovasculares como la pioglitazona, así como de otros fármacos cardiovasculares como la aspirina (Redondo et al., 2003) o las estatinas (Porreca et al., 2002), estos descubrimientos podrían tener importancia y repercusiones en el campo de la terapéutica.

Es interesante repasar, a la luz de estos resultados, las implicaciones que pueden tener en la explicación del comportamiento del TGF- β 1 como una espada de doble filo en la enfermedad cardiovascular. La mayoría de las incipientes explicaciones a este curioso fenómeno se refieren a una resistencia adquirida de las VSMC a los efectos protectores y limitantes del crecimiento que presenta esta citoquina sobre este tipo celular, así como efectos postulados relacionados con el aumento de confluencia, la sobrecarga de TGF- β 1 de origen plaquetario o el estímulo en la fibrosis (Redondo et al., 2007).

Los efectos del TGF- β 1 sobre las EPCs, como se recoge en los resultados de la presente tesis, pueden suponer un mecanismo adicional para explicar el doble efecto de la citoquina sobre la enfermedad cardiovascular. Dada la importancia de la re-endotelización temprana tras el daño vascular por angioplastia (Hutter et al., 2004) o cirugía de revascularización coronaria (Scheubel et al., 2003), la inhibición de las EPCs puede ser una explicación adicional al efecto claramente patogénico del TGF- β 1 en el fenómeno de reestenosis post-angioplastia. Esta

consideración de la restenosis post-angioplastia como una enfermedad cuyo origen puede deberse a una función alterada de las EPCs se ha visto refrendada por un estudio reciente en un modelo experimental porcino, donde un nuevo modelo de stent embebido con un tripéptido cíclico de arginina-glicina-aspartico (cRGD) acelera la reendotelización y reduce la restenosis (Blindt et al., 2006). Las secuencias RGD son típicas de proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, y son utilizadas por las células circulantes como punto de anclaje, a través de la unión con sus integrinas de membrana. Este nuevo enfoque de stents diseñados para mejorar la reendotelización en lugar de inhibir el crecimiento de las VSMC neointimales podría convertirse en una terapia más etiológica y protectora, y menos agresiva, para la prevención de la restenosis post-angioplastia. Otra diana terapéutica de probable importancia en este contexto podría ser la diferenciación de los progenitores angiogénicos circulantes hacia la vía endotelial. La médula ósea, además de EPCs, produce células que se diferencian en el vaso hacia VSMC de origen hemático, lo que puede dar lugar a un aumento del cociente íntima-media o al advenimiento de una restenosis post-angioplastia (Hristov y Weber, 2004).

Dado que la pioglitazona (Redondo et al., 2005), y probablemente otros fármacos cardiovasculares como la aspirina (Redondo et al., 2003) y las estatinas (Porreca et al., 2002), actúan sobre esa vía, será interesante comprobar las repercusiones que este hallazgo puede tener en aras de una mejor terapéutica de estos desórdenes. ¿Tiene lugar, en los pacientes, la inhibición de las EPCs mediada por fármacos cardiovasculares? ¿Puede conseguirse que estos inhiban las VSMC y estimulen las EPCs? La pregunta

que se plantea no parece tener una respuesta simplista, y futuras investigaciones se encargarán de responderla.

4. COMPLEJIDAD DEL TGF- β EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Es importante, llegados a este punto, considerar los efectos de la pioglitazona que hemos observado y relacionarlos con las concentraciones del fármaco presentes en las condiciones estudiadas. Asimismo, las posibles repercusiones que podrían tener *in vivo*, y sus implicaciones para el uso terapéutico clínico de la pioglitazona merecen ser comentadas.

El primer lugar, consideraremos los diferentes tipos celulares donde, en la presente Tesis Doctoral, se han descrito los efectos farmacológicos. Los efectos que hemos visto en los dos tipos celulares estudiados (VSMC y EPCs) son dramáticamente dependientes de la concentración. ¿Cómo se relacionan las concentraciones analizadas *in vitro* con las que se consiguen *in vivo* en el plasma de pacientes tratados con pioglitazona? La relación entre ambos modelos (cultivo celular y farmacocinética) es siempre difícil y debe ser considerada con cautela y espíritu crítico, ya que en el cultivo, las células sufren inherentemente ciertas alteraciones que imitan el alcance de los resultados encontrados. En los cultivos no existen algunos fenómenos que sí se dan en la farmacocinética clínica, como el efecto acumulativo, el efecto de dosis repetidas, o la concurrencia de complejos factores fisiológicos o patológicos que puedan afectar la acción farmacológica.

En el caso de la pioglitazona, como ya hemos descrito en el apartado que trata sobre su farmacología clínica, esta complejidad se ve aumentada por el hecho de generar metabolitos activos (Eckland y Danhof, 2000). Las concentraciones

plasmáticas pico tras la toma diaria de 40 mg (una de las posologías más frecuentes) equivalen a unos 3 $\mu\text{mol/l}$, es difícil saber si lo que se utiliza en nuestros estudios *in vitro* se le asemeja. No obtendremos un conocimiento cierto y seguro extrapolando los resultados vistos en pacientes. La dosis de 45 mg ha sido descrita como beneficiosa de la función endotelial en pacientes no diabéticos (Campia et al., 2006), y al mismo tiempo limitante de la acumulación de VSMC en los vasos al disminuir el cociente íntima-media en diabéticos de tipo 2 (Langenfeld et al., 2005).

Hay varios mecanismos que pueden postularse para este efecto que se observa *in vivo*, considerando múltiples vías.

1. Uno podría ser la dependencia del estímulo de las EPCs en el control de las VSMC. De esta manera, los efectos que tienen lugar *in vitro* en las VSMC (apoptosis), necesitarían la concurrencia de un adecuado estímulo de las EPCs y para alcanzar la acción directa vista en los cultivos de VSMC necesitan dosis no alcanzadas en la clínica. Es decir: la pioglitazona disminuye el cociente proliferación/apoptosis de las VSMC de forma indirecta, merced a su estímulo de las EPCs.
2. Otro podría ser el siguiente: la pioglitazona, a través del TGF- β , limita el crecimiento de las VSMC, pero también es capaz de inhibir la función de las EPCs. La función inhibitoria de las VSMC es más acusada, lo que se traduce en sus beneficios clínicos. Podría argüirse aquí la posibilidad de que la función inhibitoria y antiinflamatoria sobre las VSMC determinase, de forma indirecta, su

efecto beneficioso sobre las EPCs observado en estudios con pacientes. De este modo, las VSMC y los productos por ellas generados (como por ejemplo las citoquinas) realizarían *in vivo* una inhibición constitutiva de la función de las EPCs, la cual sería neutralizada por la pioglitazona. De este modo, las EPCs se estimularían *in vivo* por acción del fármaco de una manera secundaria e indirecta.

3. Sin embargo, entre los dos extremos se coloca la posibilidad real de una acción dual de forma directa. La pioglitazona estimularía las EPCs e inhibiría las VSMC. Es difícil de comprobar dada la dificultad de extrapolar las concentraciones observadas *in vitro* para uno u otro efecto, debido a la compleja farmacocinética de la pioglitazona. Futuros estudios experimentales *in vivo* con inhibición de la función de las EPCs podrían ayudar a contestar a esta cuestión de forma fehaciente.

Posiblemente, la investigación en profundidad en los mecanismos que determinan una u otra acción rinda en los años venideros una mejor utilización, en posología y posiblemente en sinergismo con otros medicamentos, de la pioglitazona en la enfermedad cardiovascular.

5. LIMITACIONES DEL PRESENTE ESTUDIO. LÍNEAS FUTURAS.

Los resultados incluidos en la presente Tesis Doctoral se han obtenido con modelos de cultivo celular, salvo los resultados clínico-epidemiológicos referidos a nuestra cohorte de pacientes.

Los cultivos celulares, como es sabido, presentan limitaciones inherentes a la técnica que hacen tomar con cautela los resultados que con tal modelo sean obtenidos. La primera de sus limitaciones es el trabajo con una sola línea celular, que elimina las posibilidades de interacción que tienen lugar *in vivo* entre los diferentes tipos celulares. Otra importante limitación se refiere a la imposibilidad de relacionar, de forma exacta y fehaciente, las concentraciones de fármaco en el medio de cultivo con las dosis que se utilizan en la clínica. El último punto de confusión puede ser la heterogeneidad, inestabilidad y cambio de las líneas celulares al ser cultivadas, respecto a las líneas celulares primarias que se encontraban sin cultivar, en el organismo en su forma primitiva.

Sin embargo, la utilidad de los cultivos celulares como un modelo muy práctico para evaluar diferentes dianas moleculares y mecanismos de acción farmacológicos permite utilizarlos como un útil punto de partida para estudios basados en modelos con menor maniobrabilidad experimental a tiempo real, pero de más cercanía con la situación clínica, como los estudios con arterias enteras sobrantes de revascularización coronaria, o la detección de EPCs directamente desde la sangre.

Dos grandes interrogantes se encuentran en el fin del presente estudio como punto de partida de líneas futuras de investigación.

1. El primero es la elucidación de los mecanismos que permiten que el TGF- β 1 pueda comportarse a la vez como inhibidor de las EPCs y de las VSMC. Esto permitiría un uso más racional de los fármacos cardiovasculares que trabajen sobre esta vía, por medio de mejoras en la posología, o sinergismo con otros fármacos que actúen sobre esa cascada.
2. El otro se refiere a la relación existente, en cada uno de los pacientes, entre las EPCs de la sangre y las VSMC del vaso, con objeto de descubrir los condicionantes de la diferenciación en uno u otro sentido y profundizar en la relación entre las células de la sangre y el vaso.

Es de esperar que el estudio práctico de estos enfoques teóricos pueda adaptarse al paradigma de la investigación cardiovascular en el presente siglo, un tiempo donde las epidémicas proporciones del crecimiento de la enfermedad cardiovascular obliguen al enfoque multidisciplinar e integrado para una investigación de transferencia desde el laboratorio a la cabecera del enfermo.

CONCLUSIONES

1. En células de músculo liso vascular de aorta de rata, la pioglitazona induce un efecto apoptótico a una concentración de 100 $\mu\text{mol/l}$, siendo este efecto mediado por la secuencia: activación de PPAR- γ , liberación de TGF- β 1, señalización de Smad2 y subsiguiente apoptosis.
2. Esta secuencia, a la misma concentración, se reproduce en células de músculo liso vascular de arteria mamaria interna de pacientes sometidos a revascularización miocárdica, tanto diabéticos como no diabéticos.
3. Sobre células progenitoras endoteliales, obtenidas de la sangre periférica de donantes sanos, la pioglitazona presente un efecto bifásico en su diferenciación y adhesión en condiciones de flujo, potenciando estos parámetros a la concentración de 1 $\mu\text{mol/l}$ y perdiendo el efecto a 10 $\mu\text{mol/l}$.
4. La pérdida de adhesión bajo flujo inducida por la pioglitazona a 10 $\mu\text{mol/l}$ está mediada por la secreción de TGF- β 1.

CONCLUSIONS

1. In vascular smooth muscle cells from rat thoracic aorta, pioglitazone exerts an apoptotic effect at a concentration of 100 $\mu\text{mol/l}$. This effect is mediated by the sequence: PPAR- γ agonism, TGF- β 1 release, Smad2 signaling and subsequent apoptotic cascade.
2. The same pharmacologic effect and underlying mechanisms take place, at the same concentration, in vascular smooth muscle cells obtained from internal mammary arteries of patients who underwent by-pass surgery. Notably, these effects took place in cells from both non-diabetic and diabetic patients.
3. Pioglitazone exerts a biphasic effect in human endothelial progenitor cell differentiation and adhesion under flow conditions: it increases these parameters at 1 $\mu\text{mol/l}$, whereas at 10 $\mu\text{mol/l}$, achieved effects are lost.
4. Loss of increased adhesion under flow conditions after incubation with pioglitazone at 10 $\mu\text{mol/l}$ is mediated by the secretion of the pleiotropic cytokine TGF- β 1.

ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION

1. ATHEROSCLEROSIS

1.1. Introduction and importance

Atherosclerosis is a vascular disease characterized by the existence of arterial lesions (atheromatous plaques) which may originate thrombosis and ischemia of distal organs. However, even in young subjects, a physiological lipid deposit seems to happen and atherosclerosis might be regarded as a pathologic evolution (Tracy et al., 1995).

A decisive milestone in the history of applied research in atherosclerosis was established by the Framingham studies, which introduced the concept “Risk factor”, that is to say, statistical associations for the disease. Cardiovascular mortality was linked to high blood pressure, high cholesterol levels, smoking, obesity and physical inactivity (Dawber et al., 1951). However, it became evident that understanding atherosclerosis as a mere passive lipid deposit in the arteries was too simplistic. Further research in the last decades of twentieth century highlighted the central role of inflammation in the pathogenic evolution of atherosclerosis (Ross, 1999), as stated by classic studies 150 years before (Virchow, 1858).

Atherosclerosis is the first cause of morbimortality in the developed world, and its increase in developing countries is exponential. To a great extent, diseased

people do not exhibit known risk factors and do not receive an adequate treatment (Moreno and Fuster, 2004).

1.2. Atherosclerosis: an inflammatory disease

1.2.1. Inflammation in vessel

Atherosclerotic lesions take place in the subendothelial layer, where inflammatory and immunologic cells infiltrate. The most important cells seem to be macrophages and Th1 T cells (Zhou et al., 1998). Several molecules regulate these extravasations, especially cell adhesion molecules (P-CAM, I-CAM, V-CAM) and chemokines, such as the SDF-1/CXCR4 system (Zernecke et al., 2005). At the same time, a hyperplasia of vascular smooth muscle cells (VSMC) takes place through the action of growth factors, especially PDGF, whereas TGF- β limits this proliferation.

Inflammation gives a special morphology to the atherosclerotic plaque. A fibrous cap covers the lesion and protects the plaque against rupture and its thrombosis induction. Inside the fibrous cap, a soft core exists, where foam cells, inflammatory cells and mediators, cholesterol deposits, fibrin and necrotic debris are found (Ross, 1999).

1.2.2. *Atherosclerosis: a systemic disease*

Inflammation in atherosclerotic lesion has its origin in blood cells and mediators. At the same time, clinical experience suggests a coincidence in time, extent and evolutionary state within atherosclerotic plaques in the whole body. Therefore, implicated organs do not only include occluded vessels, but also other structures:

- Non-occluded blood vessels. Recent research (Ruiz et al., 2006) has described cellular and molecular alterations in non-occluded vessels (internal mammary arteries).
- Blood. As a vehicle for cells and cytokines, as well as its hemodynamic and hemostatic role (Moreno and Fuster, 2004).
- Bone marrow. As a “quarrel” for immunologic-inflammatory cells from hematologic origin (Hristov and Weber, 2006).
- Liver. It is the factory for coagulation and complement factors, such as C reactive protein. It also regulates the levels of plasmatic lipoproteins (Henley et al., 2005).
- Adipose tissue. Especially cells from the central (abdominal) adipose tissue. They are able to secrete adipokines (cytokines with adipose origin). Among them, IL-1 and TNF- α seem to be the most important ones as far as cardiovascular risk is considered (Eckel et al., 2005).

1.2.3. Vascular progenitor cells

In 1997, a decisive work was published in which endothelial progenitors with bone marrow origin were isolated from adult animals (Asahara et al., 1997). Therefore, a new vascular paradigm began to gain an increasing acceptance. According to it, bone-marrow-originated endothelial progenitors may patch and repair endothelial damage. Therefore, an increase in the endothelial layer might be due to two different mechanisms:

- Angiogenesis, by means of proliferation of surrounding cells.
- Vasculogenesis (endothelial repair by endothelial progenitor cells or EPCs).

The medical importance of these endothelial precursors has been established by a growing body of evidence. It has been reported that the colony forming capacity of EPCs correlates to endothelial function (Hill et al., 2003). At the same time, these precursors are increased in response to physical training (Laufs et al., 2004) and by treatment with antiatherosclerotic drugs such as statins (Landmesser et al., 2004).

Endothelial progenitors are also under evaluation for experimental therapy (therapeutical revascularization) in ischemic heart disease (Britten et al., 2003) and low limb ischemia (Tateishi-Yuyama et al., 2002).

2. TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF-B) IN CARDIOVASCULAR DISEASE

2.1. Introduction

In 1980, the effects of a group of molecules which were called “Transforming Growth Factors” (TGF) were described. They were able to transform a fibroblast cell culture towards a tumour-like cell line and to induce both proliferative and antiproliferative effects (Todaro et al., 1980). It was described that this apparent contradiction was due to the existence of two different types of TGF: TGF- α (proliferative) and TGF- β (antiproliferative). This one includes several isotypes, the TGF- β 1 being the most important form (Blobe et al., 2000).

The effects of TGF- β are complex and cell-context dependent. Nevertheless, the most interesting effect for a growing body of scientists was the antiproliferative effect of TGF- β for a wide variety of cell lines, including tumour cell lines. Many other functions have been related to TGF- β , such as cytoskeleton rearrangement, differentiation and matrix synthesis (Massagué et al., 2000).

Due to the high complexity of the atherosclerotic process, where a lot of functions related to TGF- β become altered, the link between this cytokine and cardiovascular disease is not surprising (Grainger et al., 2004).

The pleiotropic cytokine transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) is able to regulate a wide variety of cell processes in a complex and context-dependent manner. Its role in cardiovascular diseases has become an important issue for a correct understanding of the molecular basis which regulates such disorders.

However, despite the overwhelming achievements in the knowledge of the complex regulation of the TGF- β 1 pathway in cardiovascular models, this

knowledge has not yet been translated to direct clinical benefits. Therefore, the point to be addressed refers to the possible utility of the TGF- β 1 system as a tool for evolution monitoring, as well as its potential management by target-designed molecules and currently used pharmacological interventions.

2.1.1. Signal transduction regulation

The protein TGF- β is synthesized as a prepropeptide consisting of a lone chain composed of 390 amino acids (44.3 KDa). When secreted it undergoes a process of cleavage from its C-terminal and after this process, both peptidic chains (N-terminal or active TGF- β 1 and C-terminal or latency-associated peptide) remain linked by means of non-covalent forces (Piek et al., 1999). After TGF- β 1 is released from its latency-associated peptide, it becomes able to bind the receptor system.

The pleiotropic effects of TGF- β 1 take place through a complex signal transduction pathway. The canonical signaling pathway involves its binding to TGF- β -R-II (Shi and Massagué, 2000). Thus, effective TGF- β 1 signaling depends on its membrane-bound receptor population. The most important regulation at this level seems to affect the TGF- β -R-II isoform, which is able to recruit the ligand and present it to the R-I isoform. In intestinal cell lines, TGF- β -R-II gene expression can be influenced by several inflammatory factors, such as PKC and COX-2 (Wu et al., 2003). Interestingly, it has been reported by Grainger that depletion of TGF- β 1 in the cell culture medium is able to reduce expression of TGF- β -R-II in vascular smooth muscle cells (Grainger et al., 2004). This correlates with the finding of a decreased expression of this isoform

in vascular smooth muscle cells from atherosclerotic vessels (McCaffrey et al., 1999). Therefore, the possible value of receptor downregulation as a plausible way to abrogate the cellular effects of TGF- β 1 should be taken into consideration. At the same time, the receptor has to bind the cell membrane to become effective. It has been reported that the TGF- β receptor complex is internalized, although whether this takes place through clathrin-coated pits or caveolae (Di Guglielmo et al., 2003) is still unclear.

After binding to TGF- β -R-II, the complex TGF- β 1/TGF- β -R-II is presented to TGF- β -R-I, which can present several subtypes called activin-like kinases or ALKs. This action modulates the phosphorylation of Smad family signaling proteins, thereby forming a hetero-oligomere with Smad4 (Co-Smad) and thus translocating into the nucleus, where they regulate gene transcription. Smad6 and Smad7 are considered as inhibitory Smads, since they inhibit this nuclear translocation by competing with the other Smads at the ALK site (Ten Dijke et al., 2004).

Some differential roles in the regulation of Smad2 and Smad3 (Redondo et al., 2005) have been described in vascular smooth muscle cells. Although these two molecules present a high gene homology, their molecular functions are deeply different. Smad2, unlike Smad3, is unable to directly bind DNA, since it has a sequence (exon3) which avoids this direct binding. Interestingly, the existence of a Smad2 variant which behaves like Smad3 (Yagi et al., 1999) has been reported.

The key cellular effects exerted by TGF- β 1 in endothelial cells have been shown to take place through a specific regulation (Lebrin et al., 2004). In this cell type, low doses of TGF- β 1 stimulate the ALK-1 isoform of the TGF-R-I receptor and subsequently induce phosphorylation and nuclear recruitment of second

messenger Smads1/5/8, which eventually increases cell proliferation and migration. In contrast, high doses activate ALK-4/5/7 and Smads2/3, which decrease cell proliferation and migration. The most accepted stoichiometric model considers that signaling takes place through, at minimum, a heterotetramer: two TGF-R-II and two TGF-R-I (Lebrin et al., 2005). In particular, these two TGF-R-I seem to be ALK-5/ALK-1 for the ALK-1 dependent pathway or two ALK-5 for the ALK-5 dependent one. Transition from the ALK-4/5/7 to the ALK-1 pathway is thought to be regulated by the accessory receptor endoglin or CD105 (Lebrin et al., 2004). The ALK-1→Smads1/5/8 pathways seem to be specific for endothelial lineage.

2.2. Role of TGF- β 1 in atherosclerosis and restenosis

2.2.1. Evidence for an atheroprotective effect of TGF- β 1

The protective cytokine hypothesis stands for an antiatherogenic role of this cytokine (Grainger et al., 2004).

According to this theory, TGF- β 1 exerts its protective role at several levels: control of vascular cell proliferation, maintenance of differentiation and increase in plaque stability. Another crucial feature of the antiatherosclerotic role of TGF- β is linked to its immunomodulatory and antiinflammatory effect, as reviewed by Mallat and Tedgui (Mallat and Tedgui, 2004). Emerging concepts about immunological features of atherosclerosis sustain the key role of TGF- β 1 when this effect is considered. A crucial event that seems to regulate the immunology

of this disease is related to the Th1/Th2 balance. In atherosclerosis, Th1 function (IF- γ , TNF- α) is regarded as proatherogenic through plaque instability induction, whereas Th2 (IL-4, IL-5) is protective. Balance between two states is mediated by Th3 function, which may regulate transition from Th1 to Th2 by IL-10 and, notably, TGF- β (Nilsson et al., 2005). For all this, the coming years may witness the advent of TGF- β function evaluation in Th3 cells as a surrogate marker for innovative treatments (vaccination, antibodies or other immunomodulators).

Effects of TGF- β in cardiovascular disease were initially postulated by extrapolations from cell culture models. However, some deeper insights have added an increasing strength to this protective model. In human atherosclerosis a decreased TGF- β 1 activation has been reported. An important factor which is able to block the TGF- β signaling activity at the blood vessel wall level seems to be the apolipoprotein (a) (Grainger et al., 1995). Actually, bioavailability of active TGF- β 1 is reduced after a high fat meal (O'Neil et al., 2004).

In addition to a possible reduced bioavailability, in atheromatous plaques there seems to be an impaired Smad 2/3 signaling (Kalinina et al., 2004). Shear-stress is equally able to decrease Smad signaling through increased expression of inhibitory Smads (Smads 6 and 7) (Topper et al., 1997).

In addition to these facts, the ratio of TGF- β -RII/RI has been reported to be reduced in atherosclerotic plaques (McCaffrey et al., 1995). Even micro satellite mutations of TGF- β -RII have been observed in atherosclerotic patients (McCaffrey et al., 1997), although this late observation has been found to be rare in other clinical series (Clark et al., 2001).

These associative findings were followed by inhibition approaches in order to elucidate a cause-effect relationship. Positive results were achieved. In

experimental animals an accelerated atherosclerosis was found in apo-E deficient mice that were treated with anti-TGF- β neutralizing antibodies (Mallat et al., 2001). In addition, increased plaque vulnerability was described after *in vivo* inhibition of TGF- β by treatment with soluble receptors in this same animal model (Lutgens et al., 2002).

2.2.2. A pathogenic role for TGF- β 1

In apparent contrast to its postulated protective effect, TGF- β 1 expression can be induced *in vitro* by several atherogenic stimuli such as shear stress (Negishi et al., 2001), oxidized cholesterol (Leonarduzzi et al., 2001), angiotensin II or growth factors such as PDGF (Redondo et al., 2003). However, at the same time TGF- β 1 expression has been associated with carotid plaque stability and stroke protection (Cipollone et al., 2004). Nevertheless, a future cause-effect relationship link may probably involve the use of antisense technology.

Increased TGF- β 1 expression is found in atherosclerotic clinical specimens (Panutsopoulos et al., 2005). At the same time, levels of TGF- β 1 correlate with advanced atherosclerosis (Wang et al., 1998). The use of platelet-poor plasma in these determinations rules out a contamination by platelet-secreted TGF- β 1. Blood TGF- β 1 levels also correlate with end-organ damage hypertension in some clinical samples (Laviades et al., 2000), although correlation with primary hypertension remains unclear (Lijnen et al., 2003).

Evidence for a pathogenic effect of TGF- β 1 becomes dramatically clear when post-angioplasty restenosis is considered. In post-angioplasty restenosis, a

situation where normal tissue homeostasis becomes unregulated, TGF- β is considered as a pro-restenotic factor (Chung et al., 2002) whose blood activated levels are elevated in porcine coronary angioplasty (Chamberlain et al., 2001). For all this, TGF- β can be considered as a pathological counterpart in post-angioplasty restenosis. Blockade experimental approaches sustain this idea in several independent studies. Abrogation of TGF- β by a soluble receptor in rats (Smith et al., 1999) and with adenovirus expression in mice (Kingston et al., 2001) has demonstrated an inhibitory effect of these constructs in neointimal growth after balloon injury. At the same time, the door is open to evaluate the importance of studies related to the TGF- β 1 pathway as a marker of high-risk patients among candidates for angioplasty.

In post-angioplasty restenosis an important endothelial damage takes place. A key feature of maintaining an adequate vascular repair seems to be a correct endothelial progenitor cell function (Hristov and Weber, 2004). The effects of TGF- β 1 on endothelial progenitor cells seem to take place in a biphasic fashion. Low concentrations have been described to increase the number of endothelial progenitor cells, an effect abrogated by higher doses (Henrich et al., 2004). However, we should point out that in-depth study of molecular pathways and physiological regulation of TGF- β 1 in endothelial progenitor cells are still lacking.

2.2.3. TGF- β 1: The double-edged sword

As explained above, TGF- β 1 seems to lose its protective role and even to acquire a pathogenic effect within the chronic evolution of cardiovascular disease. Determinants of this pathological switch are under evaluation.

One of the major regulators of TGF- β 1 response is TGF- β 1 bioavailability itself. Current cardiovascular risk factors such as the antifibrinolytic PAI-1 or a high fat diet have been reported to sequester active TGF- β 1 (Grainger et al., 2004). As postulated by Annes et al., (Annes et al., 2003) availability of active TGF- β 1 is an important step in its regulation that should not be ruled out.

Availability of TGF- β 1 may also be affected by secretion regulation. Although knowledge about regulation of its intracellular trafficking is still obscure, it has been reported that TGF- β 1 can be synthesized and remain intracellularly located in rat vascular smooth muscle cells in response to high glucose concentration (Lindschau et al., 2003). An interesting intracellular effect has been described in plasmacytoma cells, where intracellular TGF- β 1 is able to bind intracellularly located TGF- β -R-II and avoid its membrane location and signaling (Fernandez et al., 2004). Nevertheless, it should be pointed out that this phenomenon has not yet been reported in vascular cell models.

The medical importance of our understanding of TGF- β 1 intracellular trafficking regulation has been highlighted by two different clinical studies which describe a positive association between polymorphisms in the TGF- β 1 signaling peptide sequence and myocardial infarction in both European (Cambien et al., 1996) and Japanese (Yokota et al., 2002) subject samples. These polymorphisms were not associated with angiographically defined stenosis. However, some criticism may be made about the value of angiography for atherosclerotic lesion

growth assessment, since a significant extrinsic growth can take place in the absence of luminal obstruction (Fayad et al., 2002).

Nevertheless, understanding cardiovascular disease as a mere lack of TGF- β 1 availability is too simplistic. As commented above, signaling regulation is a key component of TGF- β 1 response that may be directly affected by inflammatory and atherosclerotic mediators. The key effects seem to involve a decreased Smad signaling (Kalinina et al., 2004) as well as a reduced TGF- β -R-II membrane expression (McCaffrey et al., 1995).

In cultured vascular smooth muscle cells as well as in blood vessels a reduced balance of TGF- β -R-II/R-I has been described as a key modulator for the transition of TGF- β 1 effects from a antiproliferative and differentiation factor (contractile phenotype) to a stimulator of extracellular matrix synthesis (synthetic phenotype) (Grainger et al., 2004). However, this model would not involve a fixed stoichiometric relationship of two TGF- β -R-II and two R-I (Lebrin et al., 2005).

The association between TGF- β 1 availability and signaling merits some comments. The protective cytokine hypothesis establishes a positive cycle between abundant TGF- β 1 availability and TGF- β -R-II/R-I expression in vascular smooth muscle cell cultures (Grainger et al., 2004). This would maintain the differentiated phenotype and control cell proliferation. At the same time, it would avoid excessive extracellular matrix synthesis.

This model is focused on vascular smooth muscle cells and therefore fails to explain the finding of both increased levels and a pathological TGF- β 1 signaling in advanced atherosclerosis, restenosis and end-organ damage hypertensive

vascular remodelling. Which external factor may be responsible *in vivo* for this TGF- β 1 overload? The most likely candidates seem to be platelet number and activity. These elements contain a high amount of active TGF- β 1 in their secretory granules (Blobe et al., 2005). A platelet-origin cytokine overload seems to be an important step in atherosclerosis. Mainstream opinions involve the atherosclerotic effect of platelets not only through hemostasis but also inflammation (Weber, 2005).

A TGF- β 1 overload may become pathogenic, especially if signaling is already altered. A switch from ALK-1 to ALK-5 has been stated to modulate TGF- β 1 dependent effects from proangiogenic to antiangiogenic in a dose-dependent manner (Lebrin et al., 2005). On the other side, in intestinal cell lines a tolerance process which decreases TGF- β 1 has been demonstrated (Sheng et al., 1999). Whether a similar tolerance process takes place in vascular models remains to be elucidated.

Another key modulator of TGF- β 1 signaling, which is likely to act in advanced cardiovascular disease, is cell confluence. Especially in restenosis, where neointimal vascular smooth muscle cells growth in a thick micro architecture (Farb et al., 2004), a high cell density may mediate the pathogenic effect of TGF- β 1.

3. TYPE 2 DIABETES AND CARDIOVASCULAR DISEASE

3.1. Type 2 diabetes mellitus

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycaemia due to an insulin secretion defect, an abnormal peripheral action of this hormone, or both mechanisms. Diabetes mellitus has been known since ancient times and was described in several civilizations, such as Greek and Egyptian. Susruta, an Indian physician from the 4th Century B.C., described two kinds of disease where sweet urine was found: one was typical from thin, young people and the other was found in rich, old, fat people (Frank et al., 1957). These descriptions correspond to the two types of diabetes which are recognised today: types 1 and 2 diabetes mellitus.

Type 1 diabetes mellitus is characterized by destruction of pancreatic beta cells (the cells which secrete insulin), which originates diabetes mellitus by an absolute decrease of insulin. Type 2 diabetes is 10 times more frequent than type 1, and it is growing in an exponential extent worldwide (Wild et al., 2004).

Physiopathology of type 2 diabetes is based on insulin resistance (Eckel et al., 2005) and closely related to obesity.

Before the coming of type 2 diabetes, in patients there is a state of glucose intolerance or pre-diabetes. This state normally happens several years before diabetes occurs. It has been demonstrated that body weight loss and physical activity can reduce diabetes incidence up to 58% (Tuomilehto et al., 2001), this habit intervention being more efficient than pharmacological prophylaxis with metformin (Knowler et al., 2002).

For historical reasons, insulin action has been traditionally considered from a “glucocentric” point of view (Eckel et al., 2005). Insulin performs some important actions in lipid metabolism. It stimulates the lipoprotein lipase and also inhibits lipolysis. Defect in insulin action is related to dyslipidemia. As discussed below, the dramatic explosion of the triad cardiovascular disease-type 2 diabetes-metabolic syndrome (Wild et al., 2004) has supposed an impulse for consideration of type 2 diabetes as a lipid metabolism alteration (Eckel et al., 2005). In addition, the consideration of diabetes as a cardiovascular disease has gained acceptance (Hsueh and Law, 1998). Coronary risk in diabetics is close to the one found in previously infarcted patients (Haffner et al., 1998).

3.2. Type 2 diabetes and metabolic syndrome

Cardiovascular disease is increasing worldwide, especially in developing countries. This pattern is thought to be due to acquisition of industrialized habits, with a global trend to increase caloric uptake and a growing physical inactivity (Wild et al., 2004).

Constellations of metabolic disorders which increase cardiovascular risk (glucose intolerance, insulin resistance, central obesity and dyslipidemia) make a cluster which is known as the metabolic syndrome. However, different definitions for this concept still remain (Eckel et al., 2005).

3.3. Physiopathology of vascular damage in type 2 diabetes

Risk, progression and severity of cardiovascular disease are increased in diabetics to a high extent and the reasons are listed below.

The most evident is the coincidence of pathogenic factors. In type 2 diabetes and metabolic syndrome, a misregulation in lipid metabolism exists and this accelerates atherosclerosis (Eckel et al., 2005). In addition, these metabolic disorders are associated with overweight, which also enhances atherosclerosis.

High glucose might also amplify atherosclerosis. High concentrations of glucose (25 mmol/l) increase COX-2 expression in VSMC (Cosentino et al., 2003). In addition, incubation in high glucose concentration (15 mmol/l) decreases the apoptotic profile in human VSMC (Ruiz et al., 2006).

Another atherosclerotic mediator in diabetes mellitus might be constituted by advanced glycation end products (AGE). Signaling of AGE by its receptor (RAGE) has been related to inflammation, oxidative stress and prothrombotic stimulus (Kislinger et al., 1999)

4. PIOGLITAZONE FOR THE TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS

4.1. Generalities about pioglitazone

Pioglitazone is a thiazolidinedione drug approved by the United States Food and Drug Administration and the European Medicament Agency for the treatment of type 2 diabetes. It binds to the PPAR- γ receptor and this action determines a conformational change, which eventually allows its interactions to other cofactors and related proteins. Activated PPAR- γ forms a heterodimer with retinoid X receptor and they activate gene expression of a DNA region called PPRE (PPAR- γ response element). There are also mechanisms of transrepression, where gene expression in regions related to inflammation (NF- κ B, c-fos/c-jun, STAT1/STAT3) is inhibited.

Pioglitazone exerts unique cardiovascular benefits compared to other members of the thiazolidinedione group. Several retrospective clinical studies describe an association with pioglitazone and decrease of cholesterol LDL (Aronoff et al., 2000; Einhorn et al., 2000; Rosenblatt et al., 2001; Kipnes et al., 2001; Scherbaum et al., 2002; Rosenstock et al., 2002). In addition, a randomized prospective comparative trial also established the beneficial effect of pioglitazone in triglyceride decrease (Goldberg et al., 2005).

4.2. Added potential therapeutical value of pioglitazone

In addition to its metabolic benefits, which have been commented above, pioglitazone is thought to exert cardiovascular actions independent to its metabolic and glycemic activity. Pioglitazone has been reported to reduce serum markers of inflammation in atherosclerosis (MCP-1, C-reactive protein, intima-media thickness, LDL) and to increase antiatherogenic factors (HDL, adiponectin) in type 2 diabetes independently of glycaemic control (Pfutzner et al., 2005). Reduction of intima-media thickness independently of glucose was corroborated in a randomized study (Langenfeld et al., 2005).

Since vascular cells and macrophages express PPAR- γ , it is predictable that some benefits of pioglitazone on cardiovascular function may be due to direct vascular effects. Bench studies sustain this idea.

Pioglitazone inhibits the proliferation/apoptosis ratio in cultured VSMC (Pasceri et al., 2000). Neointimal VSMC seem to express PPAR- γ to a higher extent, which may mediate a selective increased effect of pioglitazone at that level (Bishop-Bailey et al., 2002). In macrophages, PPAR- γ may decrease its inflammatory capacity, migration and cytokine secretion and to stimulate inverse cholesterol transport (Hsueh and Law, 2001).

Pioglitazone is also able to improve endothelial function by acting directly as an inhibitor of inflammation and apoptosis of endothelial cells (Artwohl et al., 2005). It decreases expression of cell adhesion molecules (Imamoto et al., 2004). In addition, a small pilot study has observed a significant improvement of endothelial function in non-diabetic hypertensive patients (Horio et al., 2005).

Therefore, emerging research considers pioglitazone not only as a hypoglycaemic drug for a metabolic disease, but also a cardiovascular drug for a cardiovascular disease. Deep understanding of its vascular actions and its relationship to physiological regulatory mechanisms in atherosclerosis might yield a valuable amount of knowledge for future clinical management of the epidemic of type 2 diabetes and cardiovascular disease.

MATERIAL AND METHODS

1. CELL CULTURE OBTENTION

1.1. Rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMC)

Male Wistar Kyoto rats (250 g, 8 weeks age) were used for these experiments (Animal Care Unit, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid). Animals were sacrificed by CO₂ inhalation and thoracic aorta was extracted in a flow chamber bench. From this vessel, VSMC were extracted by incubation with collagenase (0.4%), at 3 h at 37° C.

Rat VSMC were maintained in a medium composed of DMEM+10% FCS+1% antibiotic-antimicotic, in an incubator (5% CO₂ and 95% humidity). Experiments were performed with cells between passages 3 and 5. VSMC phenotype was assessed by morphologic examination (spindle-shape cells which form hills and valleys structures). Phenotype was also assessed by constitutive α -actin expression.

1.2. Human internal mammary artery VSMC

These cells were obtained by the explant method, from internal mammary arteries obtained in the surgical room of the Cardiac Surgery Service (San Carlos University Clinical Hospital, Madrid, Spain). Cells were cultured in a medium composed by RPMI 1640 supplemented with antibiotic-antifungic (1%) and 20% FCS. Phenotype was assessed by the same methods which were used in rat aortic VSMC.

1.3. Obtention of endothelial progenitor cells (EPCs) from human blood

Peripheral blood was obtained from remaining debris in blood donation bags (Universitätsklinikum Aachen, Aachen, Germany). Mononuclear cells were obtained by Ficoll centrifugation gradient and plated over fibronectin-coated plates. Cells were cultured in EGM-II medium, which was changed on day 4. Experiments were performed on day 7.

2. CELL BIOLOGY TECHNIQUES

2.1. Cell counting

Cells were trypsinized, homogenized and counted using a Neubauer's chamber.

2.2. Cell metabolic activity (XTT)

This assay is based on the conversion of tetrazolium salt XTT (Sodium 3,3,-[(Phenylamino)carbonil]-3,4,-Tetrazolium-Bis(4-metoxi-6-nitro) benzensulfonic hydrated) to a formazan coloured dye (XTT kit ®, Roche Diagnostics, Madrid). The compound was incubated at days 1, 3 and 6 after incubation. Absorbance at 450 nm was then registered.

2.3. Cytotoxicity (LDH activity)

Cell conditioned media were collected and 0.5 mg NADH diluted in 0.1 mol/l phosphate buffer were added. Absorbance day at 240 nm was then assessed up to 2.5 min.

2.4. Cell cycle assessment

This parameter was assessed by cell cytometry. Nuclei were detached by Vindelov solution (TRIS 1 mol/l, NaCl 0.5 mol/l, Tween 20® 10%, RNase 10 mg/ml in PBS, pH = 8).

Nuclei were analyzed by a FACScan (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), with Argon laser of 488 nm emission. Propidium iodide fluorescence was assessed by a 575/24-BP filter and 10000 nuclei were analyzed.

2.5. BrdU uptake

DNA synthesis was assessed by a BrdU commercial ELISA (Amersham, Barcelona, Spain), following the manufacturer's instructions. Plate was read at an absorbance of 450 nm.

2.6. DNA fragmentation

DNA fragmentation was assessed as a measurement of apoptosis. The cells were plated on 96-well plates and allowed to attach for 24 h. Cellular DNA fragmentation was measured with a commercially available cellular DNA fragmentation ELISA kit (Roche-Boehringer). Proliferating cells in 96-well microtiter plates were labeled with BrdU (10 µmol/l) overnight, washed with PBS, and treated. After treatment, the cells were washed with PBS and incubated with the kit lysis buffer (BSA, EDTA, and Tween 20) for 30 min at room temperature, and soluble BrdU-labeled DNA fragments present in the buffer were quantified using the ELISA kit following the manufacturer's instructions. DNA fragmentation was expressed as the fold increase of the control values.

2.7. Caspase-3 cellular activity

Caspase-3 activity was assessed as another measurement of apoptosis. A commercially available kit was used for this purpose, following manufacturer's instructions (Calbiochem, Scwalbach, Germany). Fluorescence (405 nm) was assessed at 24 h.

2.8. Flow adhesion assays

Laminar flow assays were performed as described (Weber et al., 1999). In brief, culture dishes (35 mm) were coated with 10 µg/ml fibronectin for 2 h at RT. The coated dishes were assembled at the lower wall of a flow chamber on the stage of an Olympus IX50 microscope (Olympus Optical Co.) with UPlanFI objective ×10. EPCs (without or with PIO treatment) were resuspended in HHMC medium (HEPES-buffered HBSS, 1 mmol/l Mg^{2+} /1 mmol/l Ca^{2+} , 0.5% BSA), kept at 37°C and perfused at 1.5 dyne/cm². After 4 min, the number of cells firmly adherent by primary interaction with the fibronectin matrix was quantified in multiple fields by analysis of images recorded with a JVC 3CCD video camera and recorder.

2.9. DNA content

Adherent cells were collected after 4 days in culture using Accutase® (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and were re-suspended in cell culture medium with or without pioglitazone (1 or 10 µmol/l). The cells were then plated on fibronectin-coated 48-well plates at a density of 40000 cells/well. After 72 h, proliferation was measured using the CyQANT® Cell Proliferation Assay Kit

(Molecular Probes, Leiden, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. Briefly, frozen cells were thawed and lysed by addition of a buffer containing the CyQANT® GR dye protected from light. Sample fluorescence was measured after 5 min of incubation in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader at 500 nm excitation and 540 nm emission wavelength. The proliferation rate was calculated as the percentage of untreated control.

3. MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

3.1. Western Blot

Cells were plated onto 6-well plates and allowed to attach for 24 h. The cells were treated with pioglitazone at 100 µmol/l in DMEM containing PDGF-BB at 10 ng/ml and BSA at 0.2% for 24 h. Then they were washed with ice-cold PBS and lysed on ice with 200 µl lysis buffer (10% glycerol, 2.3% SDS, 62.5 mmol/l Tris, pH 6.8, 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 1 µg/ml eupeptic, 1 µg/ml pepstatin, 5 µg/ml chymostatin, 1 µg/ml aprotinin, and 1 mmol/l phenylmethylsulphonyl fluoride) and boiled for 5 min. Equal amounts of protein were run on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P; Amersham, Madrid, Spain) and blocked overnight at 4° C in blocking solution (5% skimmed milk in Tris-buffered saline with Tween (TBS-T): 25 mmol/l Trizma base, 75 mmol/l NaCl, pH 7.4, and 0.1% vol/vol Tween 20). Blots were incubated with agitation at 4° C overnight in the presence of a specific anti-Smad2 (Santa Cruz Biotechnology) or anti-Smad2/3 (Calbiochem, Schwalbach, Germany) at 1:1000 in TBS-T. After

washing in TBS-T solution, the blots were further incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody diluted 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology) in the blocking solution. The blots were then washed five times in TBS-T, and antibody-bound protein was visualized with an enhanced chemoluminescence kit (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain). Smooth muscle α -actin was used as a housekeeping protein and was analyzed following the same procedure, using a specific anti- α -actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 1:1000 in TBS-T.

3.2. Confocal microscopy

The subcellular location of phospho-Smad proteins was also analyzed by confocal images of immunofluorescence-stained samples. Cells were plated onto cover slips and allowed to attach for 24 h. Then, the cells were cultured in the presence or absence of pioglitazone at 100 μ mol/l from 30 min to 3 h. In some experiments, GW9662 (2 μ mol/l) was added 30 min before treatment. The cells were washed with PBS and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.4% Triton-x100 for 30 min at room temperature. After blocking with 3% BSA in PBS, the cells were then incubated with goat polyclonal anti-phospho-Smad2 or rabbit polyclonal anti-phospho-Smad2 (1:100) for 1 h. Excess primary antibody was removed by washing with blocking solution, followed by incubation with donkey anti-goat Alexa 568 (1:100; Molecular Probes) or goat anti-rabbit Alexa 568 (1:100; Molecular, Probes) for 1 h. The cells were washed four times with blocking buffer every 5 min. Images

were captured using a Leica TCS SP2 inverted microscope. Intensity of staining was analyzed by Image J software.

3.3. Protein secretion by ELISA

To determine total (active plus acid-activatable) TGF- β 1 levels in the conditioned cell culture media of control and treated samples, we used a solid-phase TGF- β 1-specific ELISA, following manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN). The cells were cultured as described and then incubated with pioglitazone in the presence or absence of GW9662 (2 μ mol/l) for short (0.5 and 1 h) or extended (24, 48 or 72 h) time periods. After the conditioned media were collected and stored at -70° C, the attached cells were washed with ice-cold PBS, and lysed on ice with lysis buffer (10% glycerol, 2.3% SDS, 62.5 mmol/l Tris pH 6.8, 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 5 μ g/ml chymostatin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 mmol/l phenylmethylsulphonyl fluoride). Protein extracts were used to calculate the protein concentration by the bicinchionic acid (BCA) assay. Final TGF- β 1 concentration is expressed as a ratio of concentration of the secreted cytokine in cell media divided by the whole protein extract concentration.

3.4. Protein detection by FACS

For uptake of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled Ac-LDL (Dil-Ac-LDL; Biomedical Technologies, Stoughton, MA), treated cells were incubated with 4 µg/ml Dil-Ac-LDL for 4 h. The cells were then trypsinized and fixed with 2% PFA and incubated with 10 µg/ml FITC-labelled *Ulex europaeus* agglutinin-I (lectin; Sigma) for 1 h, at room temperature, protected from light.

For CD31, KDR (Kinase insert-domain or VEGF-R2) and CD14 positive cell assessment, the cells were detached with Accutase® (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and we then added 10 µg/ml anti-CD31-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-KDR-phycoerythrin (PE), or anti CD105-FITC (all from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, except anti-CD105, from Serotec, Oxford, United Kingdom). Incubation was performed for 1 h, at 4° C, protected from light.

4. CLINICAL DATA

A group of patients was recruited from those undergoing coronary artery By-pass graft surgery at the Cardiac Surgery Service (Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain). Diabetes Mellitus was defined following the criteria established by the ADA (American Diabetes Association) as fasting serum glucose concentration >126 mg/dl and use of antidiabetic oral drugs or insulin. Patient data included: age, gender, active smoker, obesity, total cholesterol, cholesterol LDL, cholesterol HDL, triglycerides, glucose and blood pressure.

Exclusion criteria of the patients included patients older than 80 years old, pathologies that affect the inflammatory status (renal failure, liver disease, etc) and cancer. IMA were collected by the surgeons during the surgical procedure, labelled and used within the next few minutes after the operations. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and we obtained informed consent from all subjects before sampling took place.

5. STATISTICS

The results are expressed as the mean \pm SD (standard deviation) and accompanied by the number of observations. A statistical analysis of the data was carried out by a Student's t test or by a one-way ANOVA when necessary. Differences with a P value of less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

1. EFFECTS ON RAT AORTIC VSMC

1.1. Effect on proliferation and cytotoxicity.

As shown in Figure 8, pioglitazone (PIO) decreases cell metabolic activity in the absence of a significant LDH activity increase (Figure 9). At the same time, treatment is able to decrease cell number, reaching a maximum at 100 $\mu\text{mol/l}$ (Figure 10), whereas this concentration did not exert a significant action when DNA synthesis was considered (Figure 11).

1.2. Apoptotic effects

Figure 12 shows the effect of PIO in apoptosis (measured as DNA fragmentation ELISA). A significant apoptotic effect is reached for the 100 $\mu\text{mol/l}$ concentration. This apoptotic effect at this concentration is reproduced when apoptosis is assessed by flow cytometry (Figure 14). Interestingly, the effect of the drug is inhibited by coincubation with anti-TGF- β 1 at 50 $\mu\text{g/ml}$. This antibody equally reverses the apoptotic effect of the drug for DNA fragmentation ELISA experiments (Figures 13 and 14) and for caspase-3 activity assessment (Figure 15).

1.3. TGF- β 1 secretion in our model

At 100 $\mu\text{mol/l}$, PIO increased TGF- β 1 secretion in our model, reaching a maximum at 30 min (Figure 16). This same concentration of exogenously added TGF- β 1 (400 pg/ml) proved able to trigger apoptosis in our model, this effect

being inhibited by coincubation with anti-TGF- β 1 at 50 μ g/ml (Figure 18). At 30 min, PIO-induced TGF- β 1 secretion was significantly inhibited by preincubation with the PPAR- γ antagonist GW9662 at 2 μ mol/l (Figure 17). And eventually, PPAR- γ dependency was further demonstrated when these results were reproduced by the usage of the non-thiazolidinedionic PPAR- γ blocker 15dPGJ2 (5 μ mol/l), as seen in Figure 19.

1.4. PIO induces Smad2 activation by PPAR- γ

Confocal immunostaining for phospho-Smad2 detection shows an increased nuclear/cytoplasmic phospho-Smad2 staining induced by PIO at 100 μ mol/l (Figures 20 and 21). This effect reaches its maximal peak at 30 min, the same time-point where maximal TGF- β 1 secretion was observed. Eventually, this PIO-induced nuclear recruitment is significantly inhibited by the PPAR- γ antagonist GW9662 at 2 μ mol/l (Figures 20 and 22).

1.5. PIO-induced Smad2 activation is TGF- β 1-dependent

As shown in Figures 23 and 24 coincubation with anti-TGF- β 1 at 50 μ g/ml proved able to inhibit PIO-induced phospho-Smad2 nuclear recruitment.

2. EFFECTS ON HUMAN INTERNAL MAMMARY ARTERY VSMC

2.1. Patient population description

A description of our cohort population is made in Table 1. Clinical data were registered in non-diabetic and diabetic subgroups.

2.2. Proliferative profile

As shown in Figure 25, PIO is able to decrease DNA synthesis when added to VSMC from non-diabetic patients at normal glucose concentrations (5 mmol/l).

2.3. Apoptosis induction

In a concentration-response curve, PIO did not exert a significant effect for neither non-diabetic nor diabetic VSMC in normal glucose concentrations (Figure 27). Nevertheless, the drug was apoptotic when VSMC from non-diabetic and diabetic patients were incubated with higher glucose concentrations such as 15 mmol/l (Figures 28 and 29, respectively).

2.4. Role of TGF- β 1 on the apoptotic effect exerted by PIO

As shown in Figures 30 and 31, the ALK-4/5/7 inhibitor SB-431542 at 10 μ mol/l was able to reverse the apoptotic effect of PIO 100 μ mol/l in non-diabetic (Figure 30) and diabetic (Figure 31) patients.

2.5. PIO-induced TGF- β 1 secretion

The drug induced a significant TGF- β 1 secretion in our cell culture model. In VSMC from non-diabetics, PIO-induced TGF- β 1 secretion reached a peak at 30 min (Figure 32), whereas in VSMC from diabetics, the peak was noted at 1 h time-point (Figure 33).

2.6. PIO-induced Smad2 activation

An increased phospho-Smad2 staining was noted after PIO incubation (100 μ mol/l) from 30 to 180 min (Figure 34). These effects were noted for both cytosolic intensity (Figure 35 and 37) and nuclear staining (Figures 36 and 38), in VSMC from non-diabetic and diabetic patients, respectively.

2.7. Role of PPAR- γ and the TGF- β pathway in PIO-induced Smad2 activation

Figure 39 shows the inhibitory effect of the ALK-4/5/7 and PPAR- γ blockers in PIO-induced Smad2 staining. Both approaches inhibit the cytosolic (Figures 40 and 41) and nuclear staining (Figures 42 and 43), in VSMC from non-diabetic and diabetic patients, respectively.

3. EFFECTS ON HUMAN ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS (EPCS)

3.1. Biphasic effects of pioglitazone on cell and CFU number

As shown in Figure 45, pioglitazone (72 h incubation) affects the total cell number in a biphasic manner. Concentration of 1 $\mu\text{mol/l}$ increased cell number, whereas 10 $\mu\text{mol/l}$ condition was unable to induce a significant difference from control. A similar trend is observed when CFU number is assessed (Figure 46). A colony is defined by a round cluster of cells surrounded by spindle-shape ones, as observed in representative microphotographs of cell cultures (Figure 44, panel B).

3.2. Pioglitazone modulates EPC characterization in a biphasic manner

As shown in Figure 48, pioglitazone affected the total number of Dil-Ac-LDL in a biphasic manner. When incubated with 1 $\mu\text{mol/l}$ of the drug (72 h), the number of these cells was increased in a significant fashion, whereas when they were incubated with a higher concentration of the drug (10 $\mu\text{mol/l}$), there was not a significant increase and a decreasing trend was even noted (Figure 49).

A biphasic effect was equally assessed when cell cultures were characterized for CD31 (Figures 50 and 51). For this marker, the observed decrease after incubation with pioglitazone at 10 $\mu\text{mol/l}$ reached statistical significance.

Nevertheless, the most dramatic change in cell characterization after pioglitazone treatment was assessed for the KDR marker (Figures 52 and 53). For this molecule, pioglitazone-induced biphasic effect was highly significant for both increase in 1 $\mu\text{mol/l}$ group and decrease when cells were incubated with 10 $\mu\text{mol/l}$ of the drug. As far as CD105 positivity is concerned, pioglitazone at 10

$\mu\text{mol/l}$ increased the number of cells which expressed this marker, and therefore here the effect was dose-dependent (Figures 54 and 55).

3.3. Pioglitazone does not affect cell proliferation

Since pioglitazone was able to exert the above-mentioned effects on EPC characterization in a biphasic manner, we tried to determine whether these actions were accompanied by changes in the proliferate profile of our cell cultures. As shown in Figure 56, no significant changes were observed when cells were cultured with pioglitazone at 1 and 10 $\mu\text{mol/l}$ for 72 h and cell proliferation was assessed.

3.4. Biphasic role of pioglitazone on EPC adhesion under flow conditions: role of PPAR- γ and TGF- β 1

As shown in Figure 57, 72 h incubation with PIO increases EPC adhesion under flow conditions for the 1 $\mu\text{mol/l}$ concentration. In order to assess PPAR- γ -dependency, a group was treated with the PPAR- γ blocker GW9662 at 2 $\mu\text{mol/l}$ and a significant reduction in PIO-mediated adhesion was reached.

3.5. Pioglitazone induces TGF- β 1 secretion: its role in EPC adhesion

Pioglitazone (PIO) induced TGF- β 1 in a time and concentration-dependent manner (Figure 58). Concentration-response curves yield a statistical difference for the 10 $\mu\text{mol/l}$ concentration of the drug. For the 1 $\mu\text{mol/l}$, a non-significant increasing trend was noted. In all cases, the highest peak took place at the 48 h time point.

Figure 59, panel B shows the effect of TGF- β 1 blockade on PIO-induced adhesion at 10 $\mu\text{mol/l}$ condition. This inhibitory approach is able to reverse the

lack of adhesive properties of this high dose, and thus remarks the necessary role of TGF- β 1 for the biphasic effect of pioglitazone on adhesion of human EPCs under flow conditions.

DISCUSSION

1. RESULTS OBTAINED IN VSMC

Results obtained in the present study allow us to understand with a deeper insight the mechanism of action of the emergent antidiabetic drug pioglitazone, especially by means of its effects on the TGF- β 1 pathway.

In VSMC, apoptotic effects of PIO at 100 μ mol/l have been described. In atherosclerosis and diabetic vascular disease, accumulation of VSMC might lead to plaque growth (Diez-Juan and Andres, 2001). This accumulation of VSMC becomes more dramatic when post-angioplasty restenosis is faced. The idea to consider VSMC as a pathological cell type is the theoretical basis for the usage of aggressive devices against them, such as coated stents with cytotoxic drugs (taxans, Bavry et al., 2005) or antiinflammatory drugs (rapamycin, Kaneda et al., 2005).

Cellular balance in any tissue depends on its cellular creation by mitosis and cell loss by apoptosis or programmed cell death (Geng and Libby, 2002). VSMC accumulation in atherosclerosis or restenosis might be due to an increase of mitotic index (Andres and Castro, 2003). However, in type 2 diabetic patients, a decreased VSMC apoptosis has been reported (Ruiz et al., 2006).

Apoptotic effects which have been related to PIO incubation in the present study may be related to some *in vivo* and clinical results. This drug has been proven to decrease experimental balloon angioplasty in animal models (Takagi et al., 2003). In addition, a PIO-mediated decrease of intima-media thickness has been

reported in retrospective (Koshiyama et al., 2001) and randomized studies (Langenfeld et al., 2005).

Experimental conditions which determine the apoptotic effect of PIO should be taken into consideration. At a high concentration (100 $\mu\text{mol/l}$), PIO induces apoptosis in rat VSMC. For human VSMC, it is necessary to incubate them with high glucose medium (15-25 mmol/l). This apparent discrepancy is explained by the fact that culture medium for rat VSMC (DMEM) has 25 mmol/l . This medium is the most used for rat VSMC cultures, perhaps due to their higher turnover compared to human VSMC (Kirschner et al., 1993).

In the present study, we demonstrate the importance of PPAR- γ for the apoptotic effect of PIO. An increased PPAR- γ expression in neointimal VSMC has been described (Bishop-Bailey et al., 2002). It is noteworthy that the decisive role of high-glucose and PPAR- γ for the apoptotic effect of PIO might mediate a molecular correlation for PIO selectivity.

Results from present study sustain the idea of a decreased TGF- β 1 function in VSMC in cardiovascular disease and its value as a molecular target for PIO treatment.

2. RESULTS OBTAINED IN EPCS

Results from the present study assess the biphasic effect of the antidiabetic drug pioglitazone on isolated human EPCs. At 1 $\mu\text{mol/l}$ concentration and 72 h incubation, it increased total cell number, CFUs and Dil-Ac-LDL/Lectin, CD31 and KDR positive cells. In addition, it increased EPC flow adhesion under these conditions.

The relationship of these *in vitro* results to the ones obtained in patients undergoing pioglitazone treatment merits some comments. At 45 mg, pioglitazone has been proven to improve endothelial function in non-diabetic patients in a randomized, double-blind controlled trial (Campia et al., 2006). At the same time, 30 mg of the drug equally reduced neointimal growth after stent implantation (Marx et al., 2005). In type 2 diabetics, pioglitazone has been reported to decrease cardiovascular risk markers independently of glycaemic control at the dose of 45 mg (Pfutzner et al., 2005) and prevent macrovascular complications in doses ranging 15-45 mg (Dormandy et al., 2005). A clinical study on the pharmacokinetics of pioglitazone reports average peak serum concentrations of 3.38 $\mu\text{mol/l}$ for 45 mg dose (Budde et al., 2003). Therefore, the stimulatory *in vitro* concentration of pioglitazone which has been reported here may be related to the one which is achieved in the sera of patients undergoing this treatment. Moreover, the stimulatory effect which has been reported in present work may mediate, at least in part, clinical cardiovascular benefits after pioglitazone treatment, not only to secondary prevention (Dormandy et al., 2005) and improvement of markers (Pfutzner et al., 2005) in type 2 diabetic patients but also for direct endothelial function stimulus (Campia et al., 2006) and prevention of restenosis after stent implantation (Marx et al., 2005) in non-diabetic patients.

We report here that the pioglitazone-mediated increase in EPC adhesion under flow conditions at the concentration of 1 $\mu\text{mol/l}$ is PPAR- γ -dependent, since the PPAR- γ blocker GW9662 at 1 $\mu\text{mol/l}$ is able to reverse it in a significant manner. A key role of PPAR- γ to maintain an adequate EPC function is highlighted by several facts. First is the description of a certain differentiation of angiogenic cluster towards endothelial lineage when incubated with molecules which are

not pioglitazone but share PPAR- γ agonism, such as rosiglitazone (Wang et al., 2004) and 15dPGJ2 (Verma et al., 2004). The first treatment even increased PPAR- γ expression (Verma et al., 2004). On the other hand, rosiglitazone, at 4 mg daily and with a potency as a PPAR- γ agonist of 10 times higher (Lebovitz et al., 2002), is able to increase both number and migratory activity of cultured EPCs obtained from type 2 diabetic patients (Pistrosch et al., 2005). Nevertheless, despite a lower potency as a pure PPAR- γ agonist, pioglitazone has been proven to possess additional clinical advantages as an antiatherosclerotic medication, such as improvement of lipid profile (increased HDL and decreased LDL and triglycerides), not only after retrospective comparison of multiple trials (Yki-Jarvinen, 2004) but also at the light of prospectively designed comparison (Goldberg et al., 2005). To our notice, this is the first report of stimulatory role of number, characterization and adhesion of cultured human EPCs under pioglitazone incubations, at concentrations which are achieved after clinical therapy of the drug.

Another question of interest extracted from the present work refers to the observed biphasic effect and its mechanistic mediation. When cells are incubated with a higher concentration of pioglitazone (10 μ mol/l), EPCs not only do not behave statistically different from control but also decrease where stained for CD31 and KDR. The question arises whether these concentrations are related to *in vivo* at normal or overdose. Inhibition of resident endothelial cell growth in response to pioglitazone has been described in cell culture models in a biphasic manner (Fukunaga et al., 2001), possibly related to the bifunctional regulation of the KDR promoter region by PPAR- γ itself (Sassa et al., 2004). On the other hand, using *in vivo* animal models, pioglitazone has been related to beneficial effects in antiangiogenic cancer therapy (Vogt et al., 2003; Panigrahy

et al., 2005) and proliferative retinopathy (Sjolie and Koller, 2004). Study on determinants for these bifunctional effects might allow a more exact determination of the best dose, agonism or antagonism for every single approach or situation.

On the search of a mechanistic mediator for biphasic effects of pioglitazone on EPCs, some reports suggest a likely link to the pleiotropic cytokine TGF- β 1. This factor exerts a biphasic effect for endothelial cell proliferation and adhesion (Lebrin et al., 2004). In addition, this biphasic effect is also shared when effects on EPC cultures are described (Henrich et al., 2004). One of the main goals of the present study consisted of searching for a possible link between TGF- β 1 and the biphasic effect of pioglitazone in cultured human EPCs. In order to assess its physiological role in pioglitazone-mediated effects on EPC adhesion under flow conditions, a widely accepted (Redondo et al., 2005) immunological blockade approach (50 μ g/ml of monoclonal anti-TGF- β 1, R&D Systems, Minneapolis, MN) was used. This blockade approach may be related to experiments to assess pioglitazone-mediated TGF- β 1 secretion in our model. Although a small trend for TGF- β 1 secretion after 1 μ mol/l incubation was observed, only the highest concentration (10 μ mol/l, where the stimulatory effect is lost) reached a statistical significance. This last effect, however, did not observe a statistical PPAR- γ -dependency at the maximum time-point (48 h incubation).

The role of TGF- β 1 in cardiovascular disease is controversial and the subject of a considerable debate. It has been implicated in atheroprotection by means of control of vascular smooth muscle growth and immune response (Grainger, 2004). However, TGF- β 1 has also been related to end-organ damage hypertension (Laviades et al., 2004) and post-angioplasty restenosis (Yamamoto et al., 2000). Results from inhibitory strategies in animal models

suggest this dual ability, since atherosclerotic plaques become fragile (Lutgens et al., 2002) and post-balloon stenosis is decreased (Yamamoto et al., 2000) when strong TGF- β 1 antagonism is performed *in vivo*. The role of EPCs as far as this dual effect of TGF- β 1 is concerned remains poorly known. Future research will be devoted to identifying the molecular pathways which may determine the complex effects of TGF- β 1 in EPCs and the way this is related to the effect of current cardiovascular drugs, such as pioglitazone, on this cell type. The identification of TGF- β 1 as a mediator of the biphasic effect of pioglitazone on EPCs may yield a valuable amount of knowledge to improve current therapeutical approaches for EPC research.

3. SYNTHESIS AND FUTURE LINES: CONCENTRATION-DEPENDENCY IN DIFFERENT CELL LINES

Results from the present study raise some questions for the future. Are concentration-dependent TGF- β effects responsible for the biphasic effect of PIO on EPCs and the apoptotic role of the drug for VSMC at high concentrations? Can both EPC stimulation and VSMC inhibition take place? How important are concentration-dependent effects on different cell types? Determinants for these questions may yield better therapeutical approaches for diabetic and non-diabetic cardiovascular disease from a bench-to-bedside approach.

	Non-diabetics	Diabetics	<i>P</i>
n	10	9	
Age	61.9±11.4	65.7±11.7	0.84*
Gender (♂/♀)	8/2	5/4	0.67 [§]
Body mass index (kg/m ²)	27.8±3.3	25.1±4.3	0.1*
Total cholesterol (mg/dl)	210.8±44.6	164.0±36.6	0.03*
LDL (mg/dl)	129.3±41.1	92.8±26.7	0.1*
HDL (mg/dl)	47.3±8.1	36.0±8.3	0.037*
Triglycerides (mg/dl)	150.8±52,6	174.0±57.0	0.4*
Glucose (mg/dl)	97.8±34.4	158.0±42.9	0.01*
Glycated hemoglobin	Non determined	7.3±0.8	-
Hypertension (N/%)	3/33	6/66	0.15 [#]
Smokers (%)	5/50	3/33	0.56 [#]

Table 1: Baseline clinical characteristics of study population.

BIBLIOGRAFÍA

Aizawa Y, Kawabe J, Hasebe N, Takehara N, Kikuchi K. Pioglitazone enhances cytokine-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells and reduces intimal hyperplasia. *Circulation* 2001;104:455-60.

Alexakis C, Mestries P, Garcia, S, Petit E, Barbier V, Papy-Garcia, D., Sagot MA, Barritault D, Caruelle JP, Kern P. Structurally different RGTAs modulate collagen-type expression by cultured aortic smooth muscle cells via different pathways involving fibroblast growth factor-2 or transforming growth factor-beta1. *FASEB J.* 2005;18:1147-49.

Andres V, Castro C. Antiproliferative strategies for the treatment of vascular proliferative disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003;1:85-98.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003;116:217-24.

Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care* 2000;23:1605-11.

Artwohl M, Holzenbein T, Furnsinn C, Freudenthaler A, Huttary N, Waldhausl WK, Baumgartner-Parzer SM. Thiazolidinediones inhibit apoptosis and heat shock protein 60 expression in human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2005;93:810-15.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-47.

Atschoff, KAL. Ueber Atherosklerose und andere Sklerosen des Gefäßsystems. Berlin, Urban & Schwarzenberg, 1908. 22 pages. (Forms No. 1, v. 4, Beih. Med. Klin.)

Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206-18.

Bakin AV, Safina A, Rinehart C, Daroqui C, Darbary H, Helfman, DM. A critical role of tropomyosins in TGF-beta regulation of the actin cytoskeleton and cell motility in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:4682-94.

Bavry AA, Kumbhani DJ, Helton TJ, Bhatt DL. What is the risk of stent thrombosis associated with the use of paclitaxel-eluting stents for percutaneous coronary intervention?: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(6):941-46.

Benditt EJ, Benditt JM. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:1753-36.

Benigni A, Zoja C, Corna D, Zatelli C, Conti S, Campana M, Gagliardini E, Rottoli D, Zanchi C, Abbate M, Ledbetter S, Remuzzi G. Add-on anti-TGF-

beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1816-24.

Besson A, Assoian RK, Roberts JM. Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer* 2005;4:948-55.

Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL. TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15548-53.

Bishop-Bailey D, Hla T, Warner TD. Intimal smooth muscle cells as a target for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand therapy. *Circ Res*. 2002;91:210-17.

Bishop-Bailey D, Warner TD. PPARgamma ligands induce prostaglandin production in vascular smooth muscle cells: indomethacin acts as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. *FASEB J*. 2003;17:1925-27.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000;342:1350-58.

Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 2005;54:1392-99.

Bolton GC, Keogh JP, East PD, Hollis FJ, Shore AD. The fate of a thiazolidinedione antidiabetic agent in rat and dog. *Xenobiotica* 1996;26:627-36.

Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, Murphy A, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter AA, Gauldie J. Progressive Transforming Growth Factor {beta}1-induced Lung Fibrosis Is Blocked by an Orally Active ALK5 Kinase Inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:889-98.

Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;108:2212-18.

Bruemmer D, Berger JP, Liu J, Kintscher U, Wakino S, Fleck E, Moller DE, Law RE. A non-thiazolidinedione partial peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Eur J Pharmacol*. 2003;466:225-34.

Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice.

Circulation 2002;106:2827-35.

Byrne CD, Wareham NJ, Martensz ND, Humphries SE, Metcalfe JC, Grainger DJ. Increased PAI activity and PAI-1 antigen occurring with an oral fat load: associations with PAI-1 genotype and plasma active TGF-beta levels. *Atherosclerosis* 1998;140:45-53.

Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996;28:881-87.

Campia U, Matuskey LA, Panza JA. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activation With Pioglitazone Improves Endothelium-Dependent Dilation in Nondiabetic Patients With Major Cardiovascular Risk Factors. *Circulation* 2006 Feb 6; [edición electrónica].

Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, Wang S, Simper D, Miller DV, Russell SJ, Litzow MR, Edwards WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4754-59.

Chamberlain J, Gunn J, Francis SE, Holt CM, Arnold ND, Cumberland DC, Ferguson MW, Crossman DC. TGFbeta is active, and correlates with

activators of TGFbeta, following porcine coronary angioplasty. *Cardiovasc Res.* 2001;50:125-36.

Chin MH, Cook S, Drum ML, Jin L, Guillen M, Humikowski CA, Koppert J, Harrison JF, Lippold S, Schaefer CT; Midwest cluster health disparities collaborative. Improving diabetes care in midwest community health centers with the health disparities collaborative. *Diabetes Care* 2004;27:2-8.

Chiquette E, Ramirez G, Defronzo R. A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. *Arch Intern Med.* 2005;164:2097-04.

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125:725-32.

Chung IM, Gold HK, Schwartz SM, Ikari Y, Reidy MA, Wight TN. Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:2072-81.

Cipollone F, Rocca B, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:246-55.

Cipollone F, Fazia M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Uchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cuccurullo F, Mezzetti A, Porreca E. Increased

expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 2004;35:2253-57.

Clark KJ, Cary NR, Grace AA, Metcalfe JC. Microsatellite mutation of type II transforming growth factor-beta receptor is rare in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;4:555-59.

Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003;107:1017-23.

Dawber TR, Meadors GF, Moore FE Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health* 1951;41:279-81.

De Gouville AC, Boullay V, Krysa G, Pilot J, Brusq JM, Lorient F, Gauthier JM, Papworth SA, Laroze A, Gellibert F, Huet S. Inhibition of TGF-beta signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2005;145:166-77.

Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* 2003;5:410-21.

Diez-Juan A, Andrés V. The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J.* 2001;15(11):1989-95.

Dong C, Li Z, Alvarez R Jr, Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell* 2000;5:27-34.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365(9468):1415-28.

Eckland DA, Danhof M. Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Exp Clin Endocrinol.* 2001;108: S234–S242.

Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1999;274:37413-20.

Einhorn D, Rendell M, Rosenzweig J, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride in combination with metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. The Pioglitazone 027 Study Group. *Clin Ther.* 2000;22(12):1395-409.

Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003;169(2):251-58.

Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, Sobol RE. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2909-14.

Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation* 2004;110:940-47.

Fayad ZA, Fuster V, Nikolaou K, Becker C. Computed tomography and magnetic resonance imaging for noninvasive coronary angiography and plaque imaging: current and potential future concepts. *Circulation* 2002;106:2026-34.

Feres F, Munoz JS, Abizaid A, Albertal M, Mintz GS, Staico R, Centemero M, Mattos LA, Maldonado G, Tanajura LF, Chaves A, Pinto I, Abizaid AS, Seixas AC, Vaz VD, Sousa A, Sousa JE. Comparison between sirolimus-eluting stents and intracoronary catheter-based beta radiation for the treatment of in-stent restenosis. *Am J Cardiol.* 2005;96(12):1656-62.

Fernandez T, Amoroso S, Sharpe S, Jones GM, Bliskovski V, Kovalchuk A, Wakefield LM, Kim SJ, Potter M, Letterio JJ. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a novel ligand-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2004;20:1247-55.

Fonseca V, Rosenstock J, Patwardhan R, Salzman A. Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA* 2000;283:1695-02.

Frank LL. Diabetes mellitus in the texts of old Hindu medicine (Charaka, Susruta, Vagbhata). *Am J Gastroenterol.* 1957;27:76-95.

Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(6):937-54.

Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1370-80.

Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, Tan MH, Khan MA, Perez AT, Jacober SJ; GLAI Study Investigators. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005; 28: 1547-54.

Gomez-Perez FJ, Fanghanel-Salmon G, Antonio Barbosa J, Montes-Villarreal J, Berry RA, Warsi G, Gould EM. Efficacy and safety of rosiglitazone plus metformin in Mexicans with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.*2002;18:127-34.

Goodman LV, Majack RA. Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor-beta receptor phenotypes as a function of cell density in culture. *J Biol Chem*. 1989;264:5241-44.

Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med*. 1995;1:174-79.

Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:399-04.

Grau R, Punzon C, Fresno M, Iniguez MA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein 1. *Biochem J*. 2005 [edición electrónica].

Grygielko ET, Martin WM, Tweed CW, Thornton PP, Harling JD, Brooks DP, Laping NJ. Inhibition of Gene Markers of Fibrosis with a Novel Inhibitor of TGF{beta}-type I Receptor Kinase in Puromycin-Induced Nephritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313:943-51.

Guo B, Koya D, Isono M, Sugimoto T, Kashiwagi A, Haneda M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta 1-induced

fibronectin expression in glomerular mesangial cells. *Diabetes* 2004;53:200-08.

Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998 Jul 23;339(4):229-34.

Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2005;54:3140-47.

Hansson GK. Vaccination against atherosclerosis: science or fiction? *Circulation* 2002;106:1599-01.

Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, Schaper J. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003;107:984-91.

Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S, Marzi I. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165. *Shock* 2004;21:13-16.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-00.

Horio T, Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K, Hiuge A, Yoshimasa Y, Kawano Y. Pioglitazone-induced insulin sensitization improves vascular endothelial function in nondiabetic patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2005;18:1626-30.

Hristov M, Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease Past, present and future. *Basic Res Cardiol*. 2006 ;101(1):1-7.

Hsueh WA, Law RE. Diabetes is a vascular disease. *J Investig Med*. 1998;46:387-90.

Hsueh WA, Law RE. PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1891-95.

Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C, Wolinsky C, Rudge JS, Wiegand SJ, Fuster V, Badimon JJ, Sauter BV. Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation* 2004;110:2430-35.

Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106:1525-31.

Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*. 2002;62:65-74.

Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15575-80.

Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, Ilyinskaya O, Smirnov V, Tararak E, Bobik A. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 ;224:1391-96.

Kamaraju AK, Roberts AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280:1024-36.

Kaneda H, Koizumi T, Ako J, Terashima M, Morino Y, Honda Y, Yock PG, Leon MB, Moses JW, Fitzgerald PJ. Impact of intravascular ultrasound lesion characteristics on neointimal hyperplasia following sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol*. 2005;96(9):1237-41.

Khan MA, St Peter JV, Xue JL. A prospective, randomized comparison of the metabolic effects of pioglitazone or rosiglitazone in patients with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes Care* 2002;25:708-11.

Kingston PA, Sinha S, David A, Castro MG, Lowenstein PR, Heagerty AM. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted transforming growth factor-beta type II receptor inhibits luminal loss and constrictive remodeling after coronary angioplasty and enhances adventitial collagen deposition. *Circulation* 2001;104:2595-01.

Kipnes MS, Krosnick A, Rendell MS, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride in combination with sulfonylurea therapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Med.* 2001;111:10-17.

Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Grainger DJ. Adult human aortic smooth muscle cells in culture produce active TGF-beta. *Am J Physiol.* 1993;265:C571-76.

Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem.* 1999;274:31740-49.

Klein S, Burke LE, Bray GA, Blair S, Allison DB, Pi-Sunyer X, Hong Y, Eckel RH; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation* 2004;110:2952-67.

Knowler WC, Hamman RF, Edelstein SL, Barrett-Connor E, Ehrmann DA, Walker EA, Fowler SE, Nathan DM, Kahn SE; Diabetes Prevention Program Research Group. Prevention of type 2 diabetes with troglitazone in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 2005 ;54:1150-56.

Koh KK, Chung WJ, Ahn JY, Han SH, Kang WC, Seo YH, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. Angiotensin II type 1 receptor blockers reduce tissue factor activity and plasminogen activator inhibitor type-1 antigen in hypertensive patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2004;177:155-60.

Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res.* 2000;45:736-46.

Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a

technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation* 2003;108(25):3134-39.

Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N, Minamikawa J, Nakamura Y. Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3452-56.

Kowalska I, Prokop J, Bachorzewska-Gajewska H, Telejko B, Kinalskal I, Kochman W, Musial W. Disturbances of glucose metabolism in men referred for coronary arteriography. Postload glycemia as predictor for coronary atherosclerosis. *Diabetes Care* 2001;24:897-01.

Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002;106:130-35.

Kylin E. Studien. Hypertonie-Hyperglykaemie-Hyperurikamiesyndrome. *Zentralblatt fun Innere Medizin* 1923;44.

Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, Drexler H. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2004;110:1933-39.

Langenfeld MR, Forst T, Hohberg C, Kann P, Lubben G, Konrad T, Fullert SD, Sachara C, Pfutzner A. Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a controlled randomized study. *Circulation* 2005;111:2525-31.

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220-26.

Laurora S, Pizzimenti S, Briatore F, Fraioli A, Maggio M, Reffo P, Ferretti C, Dianzani MU, Barrera G. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands affect growth-related gene expression in human leukemic cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:932-42.

Laviades C, Varo N, Diez J. Transforming growth factor beta in hypertensives with cardiorenal damage. *Hypertension* 2000;36:517-22.

Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, Rappaport EB, Freed MI; Rosiglitazone Clinical Trials Study Group. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:280-88.

Lebovitz HE, Kreider M, Freed MI. Evaluation of liver function in type 2 diabetic patients during clinical trials: evidence that rosiglitazone does not cause hepatic dysfunction. *Diabetes Care* 2002;25:815-21.

Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*. 2004;23:4018-28.

Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*. 2005;15:599-08.

Leonarduzzi G, Sevanian A, Sottero B, Arkan MC, Biasi F, Chiarpotto E, Basaga H, Poli G. Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF-beta1 by oxysterols: a mechanistic link between cholesterol and atherosclerosis. *FASEB J*. 2001;15:1619-21.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Association between transforming growth factor-beta and hypertension. *Am J Hypertens*. 2003;16:604-11.

Lin JT, Martin SL, Xia L, Gorham JD. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J Immunol*. 2005;174:5950-58.

Lindschau C, Quass P, Menne J, Guler F, Fiebeler A, Leitges M, Luft FC, Haller H. Glucose-induced TGF-beta1 and TGF-beta receptor-1 expression

in vascular smooth muscle cells is mediated by protein kinase C- α .
Hypertension 2003;42:335-41.

Lutgens E, Lutgens SP, Faber BC, Heeneman S, Gijbels MM, de Winther MP, Frederik P, van der Made I, Daugherty A, Sijbers AM, Fisher A, Long CJ, Saftig P, Black D, Daemen MJ, Cleutjens KB. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation* 2006;113:98-107.

Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Kotliansky VE, Damene MJ. Transforming growth factor- β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:975-82.

Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001;89:930-40.

Mallat Z., Tedgui, A. The role of transforming growth factor β in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:523-29.

Martens FM, Visseren FL, de Koning EJ, Rabelink TJ. Short-term pioglitazone treatment improves vascular function irrespective of metabolic

changes in patients with type 2 diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46:773-78.

Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:169-78.

Matsumoto Y, Uwatoku T, Oi K, Abe K, Hattori T, Morishige K, Eto Y, Fukumoto Y, Nakamura K, Shibata Y, Matsuda T, Takeshita A, Shimokawa H. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses neointimal formation after stent implantation in porcine coronary arteries: involvement of multiple mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:181-86.

Matsuyama S, Iwadate M, Kondo M, Saitoh M, Hanyu A, Shimizu K, Aburatani H, Mishima HK, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 2003;63:7791-98.

McCaffrey TA, Du BH, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, Bush HL Jr. Genomic instability in the type II TGF-beta 1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest.* 1997;100:2182-28.

McCaffrey TA, Du B, Fu C, Bray PJ, Sanborn TA, Deutsch E, Tarazona N, Shakhovitch A, Newman G, Patterson C, Bush HL Jr. The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired

resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:1627-42.

McGowan TA, Madesh M, Zhu Y, Wang L, Russo M, Deelman L, Henning R, Joseph S, Hajnoczky G, Sharma K. TGF-beta-induced Ca(2+) influx involves the type III IP(3) receptor and regulates actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282:F910-F20.

Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, Anderson IK, Khaw PT. Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:3394-01.

Mehilli J, Kastrati A, Wessely R, Dibra A, Hausleiter J, Jaschke B, Dirschinger J, Schomig A; Intracoronary Stenting and Angiographic Restenosis--Test Equivalence Between 2 Drug-Eluting Stents (ISAR-TEST) Trial Investigators. Randomized trial of a nonpolymer-based rapamycin-eluting stent versus a polymer-based paclitaxel-eluting stent for the reduction of late lumen loss. *Circulation* 2006;113(2):273-9.

Moreno PR, Fuster V. The year in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:2099-10.

Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming

growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation* 2001;104:790-95.

Muscat GE, Dressel U. Cardiovascular disease and PPARdelta: targeting the risk factors. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6:887-94.

Negishi M, Lu D, Zhang YQ, Sawada Y, Sasaki T, Kayo T, Ando J, Izumi T, Kurabayashi M, Kojima I, Masuda H, Takeuchi T. Upregulatory expression of furin and transforming growth factor-beta by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:785-90.

Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005;85:1-31.

Okada H, Takemura G, Kosai KI, Li Y, Takahashi T, Esaki M, Yuge K, Miyata S, Maruyama R, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Postinfarction Gene Therapy Against Transforming Growth Factor- β Signal Modulates Infarct Tissue Dynamics and Attenuates Left Ventricular Remodeling and Heart Failure. *Circulation* 2005;111:2430-37.

O'Neil CH, Boffa MB, Hancock MA, Pickering JG, Koschinsky ML. Stimulation of vascular smooth muscle cell proliferation and migration by apolipoprotein(a) is dependent on inhibition of transforming growth factor-beta activation and on the presence of kringle IV type 9. *J Biol Chem*. 2004;279:55187-95.

Panutsopoulos D, Papalambros E, Sigala F, Zafiropoulos A, Arvanitis DL, Spandidos DA. Protein and mRNA expression levels of VEGF-A and TGF-beta1 in different types of human coronary atherosclerotic lesions. *Int J Mol Med*. 2005;15:603-10.

Pfutzner A, Hohberg C, Lubben G, Pahler S, Pfutzner AH, Kann P, Forst T. Pioneer study: PPARgamma activation results in overall improvement of clinical and metabolic markers associated with insulin resistance independent of long-term glucose control. *Horm Metab Res*. 2005;37:510-15.

Piek E, Heldin, CH, Ten Dijke, P. Specificity, diversity and regulation in TGF-beta superfamily signalling. *FASEB J*. 1999;13:2105-24.

Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes Care* 2004;27:484-90.

Porreca E, Di Febbo C, Baccante G, Di Nisio M, Cuccurullo F. Increased transforming growth factor-beta(1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1752-57.

Raggi P, Bellasi A, Ratti C. Ischemia imaging and plaque imaging in diabetes: complementary tools to improve cardiovascular risk management. *Diabetes Care* 2005;28:2787-94.

Raskin P, Rendell M, Riddle MC, Dole JF, Freed MI, Rosenstock J; Rosiglitazone Clinical Trials Study Group. A randomized trial of rosiglitazone therapy in patients with inadequately controlled insulin-treated type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:1226-32.

Redondo S, Santos-Gallego CG, Ganado P, Garcia M, Rico L, Del Rio M, Tejerina T. Acetylsalicylic acid inhibits cell proliferation by involving transforming growth factor-beta. *Circulation* 2003;107:626-29.

Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, Padilla E, Tejerina T. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism. *Diabetes* 2005;54:811-17.

Redondo S, Ruiz E, Padilla E, Gordillo-Moscoso, Tejerina. Role of TGF- β 1 in vascular smooth muscle cell apoptosis induced by Angiotensin II. *Eur J Pharm.* 2007;556:36-44.

Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Ruiz E, Padilla E, Reguillo F, Rodríguez E, Tejerina T. Expresión de COX-2 en arterias y células vasculares de pacientes diabéticos y no diabéticos *Clin Invest Arterioscl.* 2006;18:121-27.

Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. TGF- β 1: a novel target for cardiovascular Pharmacology. *Cytokines Growth Factor Review* 2007 (en prensa).

Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 2005;111:2509-17.

Rokitansky KF. Ueber einige der wichtigsten Krankheiten der Arterien. 1852, 4: 1-72.

Rosenblatt S, Miskin B, Glazer NB, Prince MJ, Robertson KE; Pioglitazone 026 Study Group. The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Coron Artery Dis.* 2001;12:413-23.

Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004;63:423-32.

Rosenstock J, Shen SG, Gatlin MR, Foley JE. Combination therapy with nateglinide and a thiazolidinedione improves glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1529-33.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 340(2):115-26.

Ruiz E, Padilla E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *Eur J Pharmacol*. 2006;529(1-3):79-83.

Ruiz E, Gordillo-Moscoso A, Padilla E, Redondo S, Rodríguez E, Reguillo F, Briones AM, van Breemen C, Okon E, Tejerina T. Human vascular smooth muscle cells from diabetic patients are resistant to induced apoptosis due to high Bcl-2 expression. *Diabetes* 2006;55:1243-51.

Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A. Pioglitazone induces apoptosis in human vascular smooth muscle cells from diabetic patients involving the TGF-beta/ALK-4/5/7/Smad2 signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 [edición electrónica].

Rumble JR, Gilbert RE, Cox A, Wu L, Cooper ME. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces the expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in diabetic vasculopathy. *J Hypertens*. 1998;16:1603 -69.

Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-09.

Scherbaum WA, Goke B; German Pioglitazone Study Group. Metabolic efficacy and safety of once-daily pioglitazone monotherapy in patients with

type 2 diabetes: a double-blind, placebo-controlled study. *Horm Metab Res.* 2002;34:589-95.

Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2073-80.

Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005;111:2981-87.

Schultz JEJ, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest.* 2002;109:787-96.

Seargent JM, Yates EA, Gill JH. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol.* 2004;143:933-37.

Seay U, Sedding D, Krick S, Hecker M, Seeger W, Eickelberg O. TGF- β -dependent Growth Inhibition in Primary Vascular Smooth Muscle Cells is p38-dependent. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 [edición electrónica].

Seki T, Hong KH, Yun J, Kim SJ, Oh SP. Isolation of a regulatory region of activin receptor-like kinase 1 gene sufficient for arterial endothelium-specific expression. *Circ Res*. 2004;94:e72-77.

Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation* 2001;104:2376-83.

Sheng H, Shao J, O'Mahony CA, Lamps L, Albo D, Isakson PC, Berger DH, DuBois RN, Beauchamp RD. Transformation of intestinal epithelial cells by chronic TGF-beta1 treatment results in downregulation of the type II TGF-beta receptor and induction of cyclooxygenase-2. *Oncogene* 1999;18:855-67.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-00.

Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:807-21.

Siegert A, Ritz E, Orth S, Wagner J. Differential regulation of transforming growth factor receptors by angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in vascular smooth muscle. *J Mol Med*. 1999;77:437-45.

Simper D, Staboeiger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002;106:1199-04.

Smith JD, Bryant SR, Couper LL, Vary CP, Gotwals PJ, Koteliansky, V.E., et al. Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. *Circ Res*. 1999;84:1212-22.

Staub D, Meyerhans A, Bundi B, Schmid HP, Frauchiger B. Prediction of Cardiovascular Morbidity and Mortality. Comparison of the Internal Carotid Artery Resistive Index With the Common Carotid Artery Intima-Media Thickness. *Stroke* 2006, [Publicación electrónica].

Sugiyama S, Hirota H, Yoshida M, Takemura Y, Nakaoka Y, Oshima Y, Terai K, Izumi M, Fujio Y, Hasegawa S, Mano T, Nakatsuchi Y, Hori M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Novel insertional mutation in the bone morphogenetic protein receptor type II associated with sporadic primary pulmonary hypertension. *Circ J*. 2004;8:592-94.

Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B, Elson P, Malhi S, Thakkar S, Steinle R, Hsi ED. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol*. 2005;23:3773-9.

Takagi T, Yamamuro A, Tamita K, Yamabe K, Katayama M, Mizoguchi S, Ibuki M, Tani T, Tanabe K, Nagai K, Shiratori K, Morioka S, Yoshikawa J. Pioglitazone reduces neointimal tissue proliferation after coronary stent

implantation in patients with type 2 diabetes mellitus: an intravascular ultrasound scanning study. *Am Heart J*. 2003;146:E5.

Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Takeshita A. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001;276:48950-55.

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360:427-35.

Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:265-73.

Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE. Three Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5258-62.

Topper JN, Cai J, Qiu Y, Anderson KR, Xu YY, Deeds JD, Feeley R, Gimeno CJ, Woolf EA, Tayber O, Mays GG, Sampson BA, Schoen FJ, Gimbrone MA Jr, Falb D. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively

inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;19:9314-19.

Tracy RE, Newman WP 3rd, Wattigney WA, Berenson GS. Risk factors and atherosclerosis in youth autopsy findings of the Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci*. 1995;310 Suppl 1:S37-41.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001;344:1343-50.

Vague L. La differentiation sexuelle, facteur determinant des formes d'Obesité. *Presse Med*. 1947;30:339-40.

Vallejo S, Angulo J, Peiro C, Nevado J, Sanchez-Ferrer A, Petidier R, Sanchez-Ferrer CF, Rodriguez-Manas L. Highly glycated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetologia* 2000;43:83-90.

Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. London. *John Churchil Eds.*, 1858.

Vongthavaravat V, Wajchenberg BL, Waitman JN, Quimpo JA, Menon PS, Ben Khalifa F, Chow WH; 125 Study Group. An international study of the effects of rosiglitazone plus sulphonylurea in patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin.* 2002;18:456-61.

Wang XL, Liu SX, Wilcken DE. Circulating transforming growth factor beta 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 1998;34:404-10.

Wang B, Hao J, Jones SC, Yee MS, Roth JC, Dixon IM. Decreased Smad 7 expression contributes to cardiac fibrosis in the infarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1685-96.

Wang CH, Ciliberti N, Li, S-H, Szmitko PE, Weisel RD, Fedak PW, Al-Omran M, Chong WJ, Li RK, Stanford WL, Verma S. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation* 2004;109:1392-00.

Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res.* 2005;96:612-16.

Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol.* 1999;29:700-12.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.

Yagi K, Goto D, Hamamoto T, Takenoshita S, Kato M, Miyazono K. Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem*. 1999;274:703-09.

Yamazaki H, Suzuki M, Tane K, Shimada N, Nakajima M, Yokoi T. In vitro inhibitory effects of troglitazone and its metabolites on drug oxidation activities of human cytochrome P450 enzymes: comparison with pioglitazone and rosiglitazone. *Xenobiotica* 2000;30:61-70.

Yan SF, Ramasamy R, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Hudson BI, Stern DM, Lalla E, DU Yan S, Rong LL, Naka Y, Schmidt AM. RAGE and its ligands: a lasting memory in diabetic complications? *Diab Vasc Dis Res*. 2004;1:10-20.

Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:1011-22.

Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351:1106-18.

Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with

genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation* 2002;101:2783-87.

Yoshida J, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishikawa N, Nishio M, Ohtani T, Miwa T, Hori M, Masuyama T. AT1 receptor blocker added to ACE inhibitor provides benefits at advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *Hypertension* 2004;43:686-91.

Young PW, Buckle DR, Cantello BC, Chapman H, Clapham JC, Coyle PJ, Haigh D, Hindley RM, Holder JC, Kallender H, Latter AJ, Lawrie KWM, Mossakowska D, Murphy GJ, Roxbee Cox L, Smith SA. Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:751-759.

Yu W, Murray NR, Weems C, Chen L, Guo H, Ethridge R, Ceci JD, Evers BM, Thompson EA, Fields AP. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C beta II-mediated colon carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278:11167-74.

Yuan W, Varga J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem.* 2001;276:38502-10.

Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1alpha/CXCR4 axis is

instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res.* 2005;96(7):784-91.

Zhong WZ, Williams MG. Simultaneous quantitation of pioglitazone and its metabolites in human serum by liquid chromatography and solid phase extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14:465-73.

Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest.* 1998;101:1717-25.

Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ Res.* 2004;94:617-25.